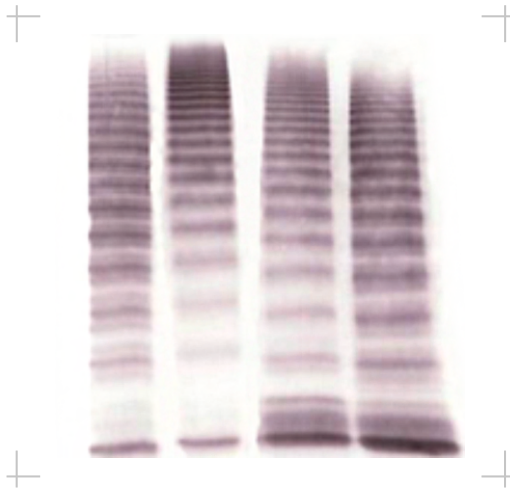


# Untersuchungen zu Triggerfaktoren der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) in Mäusen

---

**Katharina Julia Ebner**



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem  
Klinikum Veterinärmedizin,  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
Fachbereich Veterinärmedizin,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. A. Moritz

**und**

der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik,  
Hämatologie, Onkologie und Pneumologie  
Universitätsmedizin Mainz

Betreuerin: Prof. Dr. med. I. Scharrer

# **Untersuchungen zu Triggerfaktoren der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) in Mäusen**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Katharina Julia Ebner**

Tierärztin aus Filderstadt

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz  
Prof. Dr. Inge Scharrer

Tag der Disputation: 30.01.2015



Für Martin

## **INHALTSVERZEICHNIS**

|  |    |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis   | 1  |
| Abkürzungsverzeichnis  | 5  |
| 1 Einleitung   | 10 |
| 1.1 ADAMTS13   | 10 |
| 1.1.1 Struktur und Synthese                                  | 10 |
| 1.1.2 Murines Adamts13                                       | 12 |
| 1.1.3 Funktion   | 13 |
| 1.2 Der von Willebrand Faktor (VWF)                          | 14 |
| 1.2.1 Molekularer Aufbau                                     | 14 |
| 1.2.2 Synthese und Sekretion                                 | 15 |
| 1.2.3 Funktion   | 17 |
| 1.3 Thrombotische Mikroangiopathien                          | 18 |
| 1.3.1 Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP)     | 20 |
| 1.4 Adamts13-defiziente Mäuse als Modell der angeborenen TTP | 26 |
| 2 Mäuse und Materialien                                      | 30 |
| 2.1 Mäuse  | 30 |
| 2.2 Materialien  | 31 |
| 2.2.1 Antikörper   | 31 |
| 2.2.2 Primer   | 31 |
| 2.2.3 Verbrauchsmaterialien                                  | 32 |
| 2.2.4 Chemikalien  | 33 |
| 2.2.5 Puffer   | 35 |
| 2.2.6 Kitsysteme   | 37 |
| 2.2.7 Geräte   | 37 |
| 3 Methoden   | 39 |
| 3.1 DNS Gewinnung und PCR-Genotypisierung                    | 39 |
| 3.2 qRT-PCR  | 40 |
| 3.3 Adamts13 Aktivitätsbestimmung                            | 42 |
| 3.4 Von Willebrand Faktor Multimeranalyse                    | 43 |
| 3.5 Von Willebrand Faktor ELISA                              | 45 |
| 3.6 Blutentnahme   | 46 |
| 3.7 Blutbild   | 46 |

## Inhaltsverzeichnis

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.8    | Blutausstriche   | 47 |
| 3.9    | Organentnahme bei Mäusen   | 47 |
| 3.10   | Isolierung von RNS aus Mausgewebe  | 47 |
| 3.11   | cDNS Synthese aus RNS  | 48 |
| 3.12   | <i>In-vivo</i> Thrombose Modell  | 48 |
| 3.13   | Protokolle zu Untersuchungen von TTP-Triggerfaktoren   | 48 |
| 3.13.1 | Untersuchung von VWF als Triggerfaktor für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen   | 48 |
| 3.13.2 | Untersuchung von Histonen als Triggerfaktoren für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen  | 50 |
| 3.13.3 | Untersuchung von Chinin als Triggerfaktor für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen  | 50 |
| 3.13.4 | Entzündungsmodell der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung  | 52 |
| 3.13.5 | Das <i>Aspergillus fumigatus</i> Pneumoniemodell   | 52 |
| 3.14   | Statistische Auswertung  | 53 |
| 4      | Ergebnisse   | 54 |
| 4.1    | Charakterisierung der Adamts13-defizienten Mäuse   | 54 |
| 4.1.1  | DNS-Genotypisierung von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen  | 54 |
| 4.1.2  | RNS-Genotypisierung von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen mittels qRT-PCR  | 54 |
| 4.1.3  | Adamts13-Aktivitätsvergleich im Plasma von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen   | 57 |
| 4.1.4  | VWF-Antigen Vergleich im Plasma von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen  | 59 |
| 4.1.5  | VWF-Multimerstrukturvergleich im Plasma von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen  | 60 |
| 4.1.6  | Vergleich der Blutbilder von Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäusen   | 63 |
| 4.2    | Überprüfung des prothrombotischen Status der Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse   | 65 |
| 4.3    | Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse als Modell für die Untersuchung der angeborenen TTP: Auslösung der TTP durch i.v. Injektion von 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF | 66 |
| 4.4    | Ein humanes VWF Konzentrat löst keinen Thrombozytenabfall in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen aus, auch nicht in sehr hoher Dosierung                          | 71 |
| 4.5    | Vergleich des Multimerusters von rhVWF und isoliertem humanem VWF  | 73 |

## Inhaltsverzeichnis

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.6   | Erhöhung des endogenen VWF-Plasmaspiegels mittels Histamininjektion löst keinen Thrombozytenabfall in Mäusen aus                     | 75  |
| 4.7   | Untersuchung von Histonen als Triggerfaktoren für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen  | 79  |
| 4.8   | Untersuchung von Chinin als Triggerfaktor für TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen  | 80  |
| 4.8.1 | Einfluss der hochdosierten Chininbehandlung auf Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäuse   | 80  |
| 4.8.2 | Einfluss der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung auf Adamts13 <sup>-/-</sup> - und Wildtypmäuse                      | 84  |
| 4.9   | Untersuchungen zum Einfluss von Infektionen als potentielle Triggerfaktoren für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen            | 87  |
| 4.9.1 | Untersuchung der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung als Triggerfaktor für TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen                 | 87  |
| 4.9.2 | Untersuchung der <i>Aspergillus fumigatus</i> -induzierten Pneumonie als Triggerfaktor für die TTP in Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen | 89  |
| 5     | Diskussion   | 96  |
| 5.1   | Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung von Triggerfaktoren der angeborenen TTP   | 96  |
| 5.2   | Die Rolle des VWFs als Triggerfaktor für die TTP   | 102 |
| 5.3   | Die Histon-induzierte Thrombozytenaktivierung ist bei Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen geringer ausgeprägt als bei 129/Sv Mäusen       | 104 |
| 5.4   | Die Rolle von ADAMTS13 bei Chinin-bedingter Thrombozytopenie   | 107 |
| 5.5   | Bakterielle Entzündungen und Pilzinfektionen der Lunge sind keine Triggerfaktoren für TTP bei Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen         | 109 |
| 6     | Zusammenfassung  | 113 |
| 7     | Summary  | 115 |
| 8     | Literaturverzeichnis   | 117 |
| 9     | Abbildungsverzeichnis  | 129 |
| 10    | Tabellenverzeichnis  | 134 |
| 11    | Erklärung zur Dissertation   | 135 |
| 12    | Wissenschaftliche Beiträge   | 136 |
| 12.1  | Poster auf Kongressen  | 136 |
| 12.2  | Veröffentlichungen   | 137 |

|    |            |
|----|------------|
| 13 | Danksagung |
|----|------------|

|     |
|-----|
| 138 |
|-----|

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| °C                      | Grad Celsius   |
| µg                      | Mikrogramm   |
| µl                      | Mikroliter   |
| µM                      | Mikromol   |
| A                       | Ampere   |
| A. fumigatus            | Aspergillus fumigatus  |
| Abb.                    | Abbildung  |
| ADAMTS13                | humanes ADAMTS13, engl.: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13; kursiv: Gen, nicht kursiv: Protein |
| Adamts13                | murines Adamts13, engl.: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13; kursiv: Gen, nicht kursiv: Protein |
| Adamts13 <sup>-/-</sup> | Adamts13-defiziente Mäuse  |
| AK                      | Antikörper   |
| APS                     | Antiphospholipid Syndrom   |
| BALF                    | Bronchoalveolar-Flüssigkeit  |
| BCIP/NBT                | engl.: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium   |
| Bis-Tris                | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane  |
| Bp                      | Basenpaare   |
| BSA                     | Bovines Serumalbumin   |
| cAMP                    | Cyclisches Adenosinmonophosphat  |
| cDNS                    | engl.: complemetary DNS (deutsch: komplementäre DNS)   |
| CFU                     | engl.: Colony Forming Units (deutsch: koloniebildende Einheiten)   |
| cm                      | Zentimeter   |
| Ctrl.                   | engl.: Control (deutsch: Kontrolle)  |

## Abkürzungsverzeichnis

|                     |   |
|---------------------|---|
| Ct-Wert             | engl.: cycle Threshold (deutsch: Schwellenwert-Zyklus)  |
| CUB                 | engl.: complement components C1r/C1s, urichin epidermal growth factor, and bone-morphogenic protein-1 |
| Cys                 | Dreibuchstabencode der Aminosäure Cystein   |
| D+HUS               | HUS mit Enterobakterien   |
| Da                  | Dalton  |
| DAB                 | Diaminobenzidin   |
| dd H <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes Wasser  |
| DIG/DIC             | disseminierte intravasale Gerinnung/Coagulopathy; auch Verbrauchskoagulopathie                        |
| Dis                 | Disintegrin   |
| dl                  | Deziliter   |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid  |
| DNS                 | Desoxyribonukleinsäure  |
| E.coli              | Escherichia coli  |
| EDTA                | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EHA                 | engl.: European Hematology Association  |
| ELISA               | engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  |
| Em                  | Emission  |
| Ex                  | Exzitation  |
| FACS                | engl.: fluorescence-activated cell sorting; Durchflusszytometrie                                      |
| FFP                 | engl.: fresh frozen plasma; gefrorenes Frischplasma   |
| FRETs               | Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer   |
| g                   | Gramm   |
| GTH                 | Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung  |
| h                   | engl.: hour (deutsch: Stunde)   |
| HE                  | Hämatoxylin-Eosin   |
| HELLP               | Haemolysis, Elevated Liver enzyme levels, Low Platelet count  |
| HIT                 | Heparin-induzierte Thrombozytopenie   |

## Abkürzungsverzeichnis

|      |   |
|------|---|
| HIV  | humanes Immundefizienz Virus                                    |
| HRP  | engl.: horse radish peroxidase (deutsch: Meerrettichperoxidase) |
| HUS  | hämolytisch-urämisches Syndrom                                  |
| i.p. | intraperitoneal   |
| i.t. | intratracheal   |
| i.v. | intravenös  |
| IAP  | intrazisternales A-Partikel                                     |
| IgG  | Immunglobulin G   |
| IL   | Interleukin   |
| ISTH | engl.: International Society on Thrombosis and Haemostasis      |
| kb   | Kilobase  |
| kBp  | Kilobasenpaare  |
| kDa  | Kilodalton  |
| kg   | Kilogramm   |
| KGW  | Körpergewicht   |
| KO   | Knockout  |
| l    | Liter   |
| LDH  | Laktatdehydrogenase   |
| LPS  | Lipopolysaccharide  |
| M    | Mol   |
| mA   | Milliampere   |
| Met  | Dreibuchstabencode der Aminosäure Methionin                     |
| Mg   | Milligramm  |
| min  | Minute  |
| ml   | Milliliter  |
| mm   | Millimeter  |
| mM   | Millimolar  |
| mRNS | messenger RNS   |



## Abkürzungsverzeichnis

|             |   |
|-------------|---|
| n.s.        | nicht signifikant   |
| NAC         | N-Acetylcystein   |
| Neg.        | negativ   |
| ng          | Nanogramm   |
| NIBIO       | engl.: National Institute of Biomedical Innovation                        |
| nm          | Nanometer   |
| NO          | Stickstoffmonoxid   |
| NP          | Normalpoolplasma  |
| OD          | engl.: Optical Density (deutsch: optische Dichte)                         |
| P           | Propeptid   |
| PBS         | engl.: phosphate buffered saline (deutsch: phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR         | engl.: Polymerase Chain Reaction (deutsch: Polymerase Kettenreaktion)     |
| PFA         | Paraformaldehyd   |
| qRT-PCR     | quantitative Real-time PCR  |
| RCoU        | Ristocetin Cofaktor Unit  |
| RGD-Sequenz | Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparginsäure      |
| RGE-Sequenz | Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Glutaminsäure      |
| rhVWF       | rekombianter humaner von Willebrand Faktor                                |
| RNS         | Ribonukleinsäure  |
| rpm         | engl.: revolutions per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)           |
| S           | Signalpeptid  |
| s.c.        | subkutan  |
| SDS         | engl.: sodium dodecyl sulfate (deutsch: Natriumlaurylsulfat)              |
| sec         | Sekunden  |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| SEM           | engl.: standard error of the mean (deutsch: Standardfehler)                                   |
| Stx           | Shigatoxin  |
| TAE-Puffer    | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer   |
| TierSchG      | Tierschutzgesetz  |
| TMA           | thrombotische Mikroangiopathie  |
| TMB           | Tetramethylbenzidin   |
| TNF- $\alpha$ | Tumor Nekrose Faktor $\alpha$   |
| Tris          | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| Tsp           | Thrombospondin  |
| TTP           | thrombotisch-thrombozytopenische Purpura  |
| Tyr           | Dreibuchstabencode der Aminosäure Tyrosin   |
| U             | Unit  |
| UL VWF        | ultralanger von Willebrand Faktor   |
| V             | Volt  |
| VEGF          | engl.: vascular endothelial growth factor (deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) |
| VOD           | engl.: veno-occlusive disease (deutsch: Venöse Verschlusskrankheit)                           |
| VWF           | von Willebrand Faktor   |
| VWF:AG        | von Willebrand Faktor Antigen Konzentration   |
| VWF:RCoU      | von Willebrand Faktor Ristocetin Cofaktor Unit  |
| WT            | Wildtyp   |
| ZVTE          | Zentrale Versuchstiereinrichtung  |

# 1 EINLEITUNG

Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine seltene, lebensbedrohliche Erkrankung, die durch immer wieder auftretende Schübe von mikrovaskulären Thrombosen gekennzeichnet ist. Die Entdeckung und Auflösung der Funktion und Struktur von ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13) führte zu der Erkenntnis, dass ein Mangel oder auch ein vollständiges Fehlen dieser Protease zwar eine Voraussetzung für die Entwicklung der Erkrankung darstellt, nicht jedoch die alleinige Ursache für einen akuten Schub ist. Es sind einige TTP-Patienten beschrieben, die eine angeborene Defizienz der ADAMTS13 Protease haben, jedoch viele Jahre frei von Krankheitssymptomen sind. Bei diesen Patienten konnte die Erkrankung meist erst durch das zusätzliche Auftreten eines Triggerfaktors, der einen akuten Schub auslöste, diagnostiziert werden. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Motto et al. (2005) und Banno et al. (2006), die unabhängig voneinander ADAMTS13-defiziente Mäuse gezüchtet haben [1-3]. Obwohl im Blut dieser Tiere die Protease Adamts13 nicht vorhanden ist und ultralange von Willebrand Faktor (UL VWF) Multimere auftraten, entwickelten sich diese Mäuse normal ohne klinische Anzeichen einer TTP. Beide Forschergruppen kamen somit übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass eine ADAMTS13-Defizienz als alleiniger Faktor nicht ausschlaggebend für die Erkrankung TTP ist, sondern weitere Triggerfaktoren benötigt werden. Einige davon sind bekannt, wie z.B. Infektionen und Medikamente. Der Mechanismus dieser Auslösung ist jedoch noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, ein Mausmodell zur weiteren Erforschung der Triggerfaktoren der TTP zu etablieren, um anschließend diese bereits bekannten, sowie evtl. neu aufgetretene Triggerfaktoren zu untersuchen und somit die Pathogenese der Erkrankung näher zu erforschen.

## 1.1 ADAMTS13

ADAMTS13 steht für „a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains“ und ist eine Plasmaprotease, die den VWF als spezifisches Substrat spaltet. Weitere Interaktionspartner sind bisher nicht bekannt [4].

### 1.1.1 STRUKTUR UND SYNTHESE

ADAMTS13 gehört zur Familie der zink-abhängigen ADAMTS Metalloproteasen [5]. Bisher sind 19 ADAMTS Gene im menschlichen Genom bekannt [5]. Die genaue Funktion der einzelnen Mitglieder dieser Proteasenfamilie ist nur zum Teil bekannt. Sie

## Einleitung

spielen unter anderem eine wichtige Rolle im Auf – bzw. Abbau der extrazellulären Matrix und sind daher an verschiedenen Prozessen wie Angiogenese, Reproduktion und Organogenese beteiligt [6]. ADAMTS13 ist ein Mitglied dieser Familie, das intensiv erforscht wurde und immer noch wird [7].

Bereits 1982 wurde das Vorkommen einer VWF-spaltenden Protease vermutet, was 1996 sowohl durch Furlan als auch durch Tsai unabhängig voneinander bestätigt werden konnte [8-10]. Die genaue Aminosäurenstruktur sowie das Gen der Protease konnte 2001 von Zheng und Levy aufgeklärt werden [11, 12].

Das *ADAMTS13*-Gen liegt auf Chromosom 9 (9q34) und die Größe der genomischen DNA beträgt 37 kBp [11]. Das Protein besteht aus 1427 Aminosäuren und enthält die gemeinsamen Domänen der Mitglieder der ADAMTS-Familie: ein Signalpeptid, ein Propeptid, eine Metalloproteasendomäne, eine Disintegrindomäne, eine cysteinreiche (cys) Domäne mit einer RGD-Sequenz, einen Spacer, 8 Thrombospondin-ähnliche (Tsp-like) Motive und 2 C-terminale CUB-Domänen. CUB steht für „complement components C1r/C1s, *ur*ichin epidermal growth factor, and *b*one-morphogenic protein-1“ [11]. Die CUB-Domänen sind bisher einzigartig für die Proteasen der ADAMTS-Familie [13].

Das Propeptid von ADAMTS13 hat eine Bindungsstelle für Furin und wird während der Sekretion der Protease abgespalten, sodass das N-terminale Ende der maturen ADAMTS13 Protease im Plasma mit der Metalloproteasendomäne beginnt [11]. Dies ist eine Besonderheit von ADAMTS13 im Vergleich zu anderen Mitgliedern der ADAMTS-Familie, bei denen das Propeptid die enzymatische Aktivität der Protease unterbindet oder eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung hat. ADAMTS13 ist auch mit seinem Propeptid proteolytisch aktiv und nach Abspalten des Propeptids wird die Aktivität nicht verändert, sodass die Rolle des Propeptids bisher ungeklärt ist [14]. Die Metalloproteasendomäne enthält das aktive Zentrum mit den Kationen Zink und Calcium [11, 15].

Die C-terminale Domäne mit der Disintegrindomäne, dem ersten Tsp-like Motiv, der Cys-reichen Domäne und dem Spacer ist bedeutend für die Erkennung und Spaltung des VWFs [16]. Ohne Spacer ist die enzymatische Aktivität deutlich verringert. Die RGD Sequenz in der Cys-reichen Domäne ist eine potentielle Bindungsstelle für Integrine, wobei die Sekretion und Aktivität durch eine Mutation von RGD zu RGE nicht verändert wird [17, 18].

## Einleitung

Die Aufgaben der weiteren C-terminalen Domänen sind noch nicht ausreichend bekannt, wobei vermutet wird, dass sie eine Rolle in der Erkennung des VWF spielen [19].

ADAMTS13 wird hauptsächlich in den Sternzellen der Leber gebildet, sodass die Leber bisher als wichtigste Produktionsquelle für ADAMTS13 angesehen wird [20, 21]. Aber auch in anderen Zellen, unter anderem in Thrombozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße, konnte die Expression nachgewiesen werden [22-24].

Die Plasmakonzentration beim Menschen beträgt ca. 0,5 – 1,0 µg/ml mit einer Halbwertszeit von 2 – 4 Tagen [25, 26].

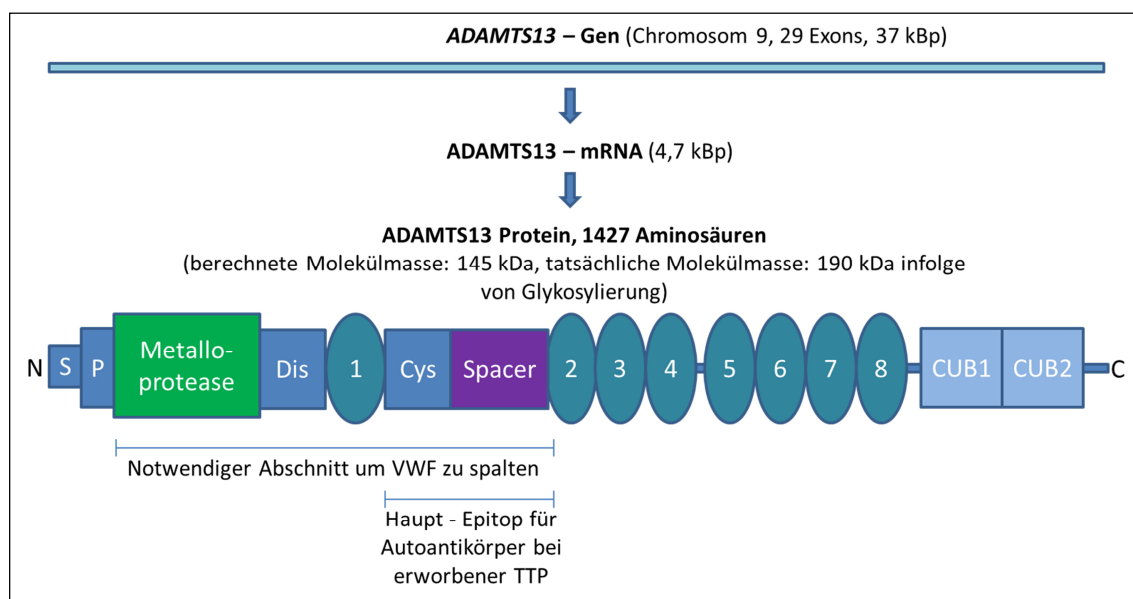


Abbildung 1: Humanes ADAMTS13-Gen und Protein modifiziert nach Zheng et al. 2001 [11] und Banno und Miyata 2008 [7]. S Signalpeptid; P Propeptid; Dis Disintegrindomäne; Cys cysteinreiche Domäne; CUB complement components C1r/C1s, urichin epidermal growth factor and bone morphogenic protein

### 1.1.2 MURINES ADAMTS13

Bei Mäusen konnten zwei verschiedene Mausstamm spezifische *Adamts13*-Gene gefunden werden [27]. In den Mausstämmen 129/Sv, FVB/NJ und CAST/EiJ wurde dasselbe *Adamts13*-Gen nachgewiesen wie beim Menschen. Es enthält 29 Exone und codiert für ein Protein (Adamts13L) mit derselben Domänenstruktur wie die humane ADAMTS13. Andere Mausstämme dagegen besitzen in Intron 23 des *Adamts13*-Gens ein sogenanntes intrazisternales A-Partikel (IAP) Retrotransposon. Hierbei handelt es sich um ein endogenes transponierbares Element, das ca. 2000-mal im Mausgenom vorkommt. Retrotransposone besitzen eine hohe Ähnlichkeit mit Retroviren und können die Transkription beeinflussen. Bei *Adamts13* führt dies zum Einbau eines vorzeitigen Stoppcodons und somit zur Bildung einer verkürzten Adamts13 Protease

## Einleitung

(Adamts13S). Es fehlen zwei C-terminale Tsp1-Motive und zwei CUB -Domänen, was sich in einer deutlich verminderten Adamts13 Aktivität äußert [28]. Die verkürzte Adamts13 Form kommt unter anderem in den Mausstämmen C57BL/6, BALB/c, DBA/2 und C3H/He vor (Abbildung 2) [27].

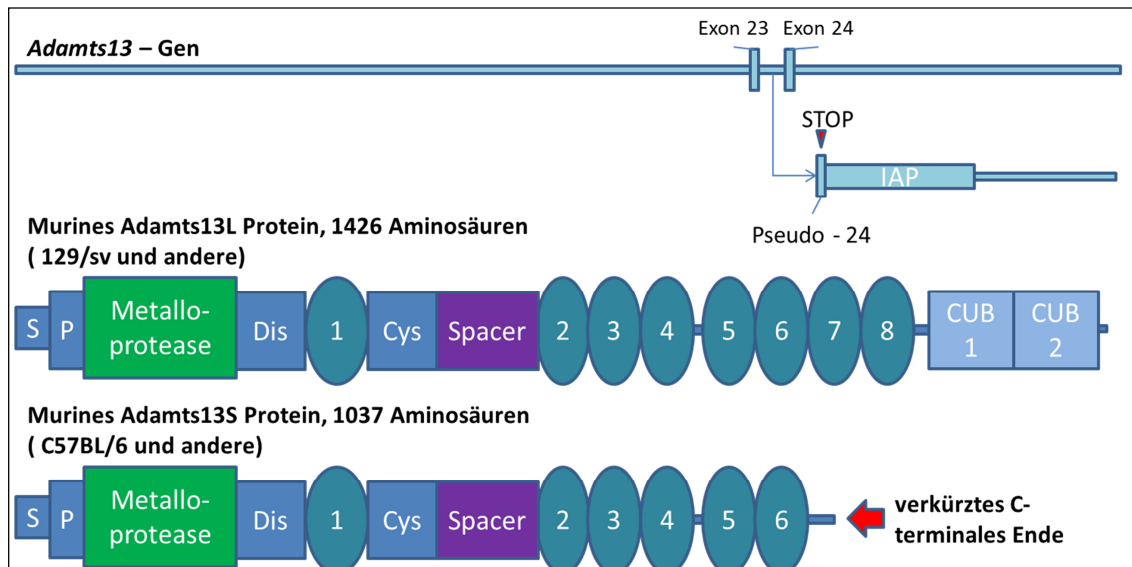


Abbildung 2: Murines Adamts13 modifiziert nach Zheng et al. 2001 [11] und Banno und Miyata 2008 [7]. S Signalpeptid; P Propeptid; Dis Disintegrindomäne; Cys cysteinreiche Domäne; CUB complement components C1r/C1s, urichin epidermal growth factor and bone morphogenic protein; IAP intrazisternales A-Partikel Retrotransposon

### 1.1.3 FUNKTION

Der VWF ist bisher das einzige bekannte Substrat von ADAMTS13. Die Bindung erfolgt über die CUB-Domäne von ADAMTS13 in der A3-Domäne des VWFs, welcher dann in der A2-Domäne zwischen den Aminosäuren Tyr1605 – Met1606 gespalten wird [11]. Hierzu benötigt ADAMTS13 Calcium und Zink-Ionen, die die Aktivität verstärken [29]. Die Bindungsstelle des VWFs ist unter physiologischen Bedingungen aufgrund seiner Faltung nicht zugänglich. Die UL VWF Multimere haben jedoch eine veränderte Konformation, sodass die A3-Domäne zugänglich wird. Nach der Sekretion aus den Weibel-Palade-Körperchen sind UL VWF Multimere zunächst über P-Selektin im Endothel verankert und werden hier von ADAMTS13 direkt gespalten [30-33]. Die Spaltung führt dazu, dass die verbleibenden kleineren VWF Multimere nicht reaktiv sind und erst unter pathologischen Bedingungen aktiviert werden.

Auch frei im Plasma gelöster VWF kann von ADAMTS13 gespalten werden. Dies erfolgt vor allem, wenn der VWF als Komplex gebunden an Thrombozyten vorliegt [34]. Ein weiterer wichtiger Faktor ist Scherstress, der eine Konformationsänderung des VWFs bewirkt und diesen dadurch für ADAMTS13 besser zugänglich macht [35-37].

Werden die UL VWF Multimere infolge einer verminderten ADAMTS13 Aktivität nicht ausreichend gespalten, führt dies zu einer erhöhten Gerinnungsneigung und kann somit eine TTP auslösen [8, 38, 39]. Die hoch reaktiven UL VWF Multimere binden vermehrt Thrombozyten, was mit einer Mikrothrombenbildung einhergeht. Gleichzeitig kommt es durch den erhöhten Verbrauch der Thrombozyten zu einer Thrombozytopenie. Die mechanische Schädigung der Erythrozyten im Bereich der Mikrothrombosen führt zur hämolytischen Anämie und die Okklusion der Gefäße kann mit Organschäden einhergehen [40].

Die Korrelation zwischen verminderter ADAMTS13 Aktivität und TTP ist allerdings noch nicht ausreichend geklärt, da einerseits nicht alle TTP-Patienten eine erniedrigte ADAMTS13 Aktivität aufweisen und andererseits eine erniedrigte ADAMTS13 Aktivität nicht zwangsläufig mit der Ausbildung einer TTP einhergeht [41].

## 1.2 DER VON WILLEBRAND FAKTOR (VWF)

Der VWF ist ein Glykoprotein, das eine wichtige Rolle im Blutgerinnungssystem spielt. Einerseits bewirkt er die Adhäsion von Thrombozyten an das Gefäßendothel, andererseits verhindert er, als Trägerprotein des Faktor VIII, dessen vorzeitigen Abbau [42-45].

### 1.2.1 MOLEKULARER AUFBAU

Das Gen des VWF liegt auf Chromosom 12 und besteht aus 178 kBp, die sich auf 52 Exone und Introne verteilen [46]. Das primäre Translationsprodukt ist ein Polypeptid, das aus 2813 Aminosäuren besteht [47]. Nach Abspaltung des Propeptides besteht das mature VWF-Monomer aus 2050 Aminosäuren [48]. Der VWF ist modular aufgebaut, wobei die kleinste VWF-Untereinheit (Monomer) aus vier Domänen (A-D) gebildet wird (Abbildung 3) [49].

## Einleitung

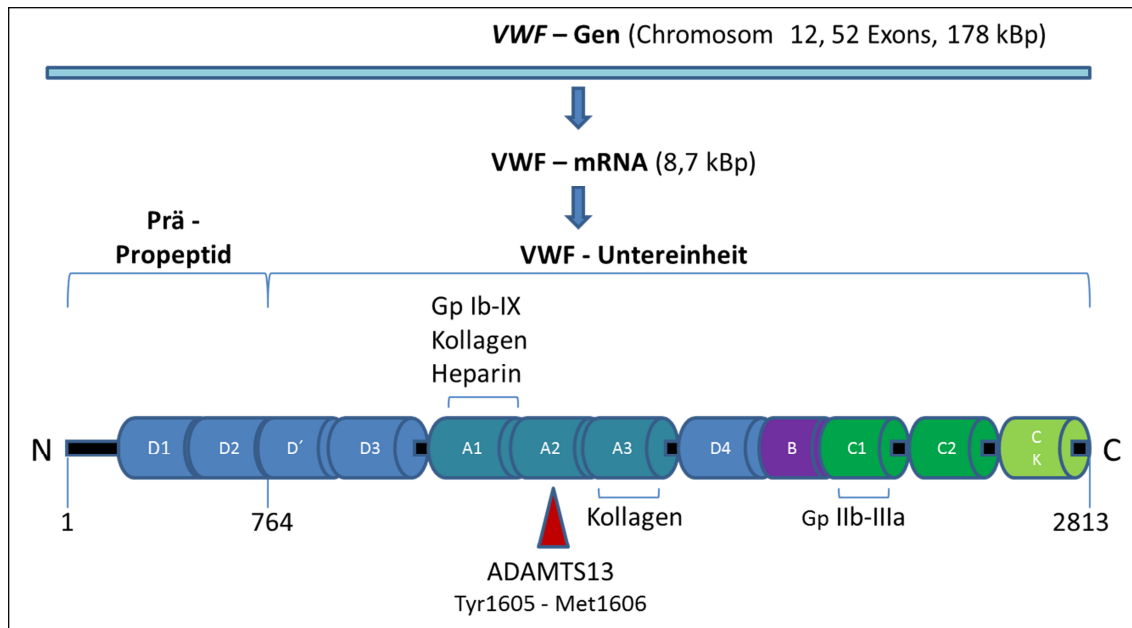


Abbildung 3: Die Domänenstruktur des VWF-Moleküls modifiziert nach Schneppenheim und Budde [50] und Tsai [40] mit ihren funktionellen Gruppen. *kBp* Kilobasenpaare, mRNA Messenger-RNA

Die A1-Domäne enthält das Epitop für die Bindung von Thrombozyten über den Glykoproteinrezeptor Ib-IX. Das Epitop für die Bindung des Thrombozytenrezeptors IIb-IIIa liegt dagegen in Domäne C1, welche auch die RGD Sequenz enthält [40]. RGD steht für die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Sie kommt in verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix vor und dient der Integringrezeptor-vermittelten Zelladhäsion.

In der A1- und A3-Domäne befinden sich zwei Bindungsstellen für Kollagen [51-54]. Darüber hinaus befindet sich in der A1-Domäne zusätzlich eine Bindungsstelle für Heparin [55].

Die Bindungsstelle für Faktor VIII liegt in der D'- bis D3-Domäne im N-terminalen Teil der VWF-Untereinheit und interagiert mit dem sulfatierten N-terminalen Abschnitt der leichten Kette des Faktors VIII [56-58]

Die von Willebrand Faktor spaltende Protease ADAMTS13 greift in der A2-Domäne des VWFs zwischen den Aminosäuren Tyr1605 und Met1606 an [9].

### 1.2.2 SYNTHESE UND SEKRETION

Die Bildung des VWFs erfolgt ausschließlich in Endothelzellen und Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten [59]. Der VWF kommt im Körper in drei Formen vor: im Plasma gelöst, an die Basalmembran (extrazelluläre Matrix) gebunden und intrazellulär gespeichert in den Granula der Endothelzellen und Thrombozyten [60].



## Einleitung

Der im Plasma zirkulierende Anteil des VWFs stammt zu ca. 90% aus Endothelzellen [40].

Das proVWF Monomer wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet und über Disulfidbrücken am C-terminalen Ende zu Dimeren verknüpft. Die Dimere gelangen in den Golgi-Apparat, in dem Homopolymere und Multimere gebildet werden. Dies erfolgt über zusätzliche Disulfidbrücken in der Nähe des N-Terminus [59].

Der Großteil des VWFs wird in speziellen Zellorganellen der Endothelzellen, den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert [61]. In Thrombozyten wird er in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und bei Aktivierung der Thrombozyten ins Plasma ausgeschüttet [62, 63]. Ein geringer Anteil des VWFs wird kontinuierlich von den Endothelzellen in das Subendothelium und Blutplasma abgegeben [60, 64]. Die stimulierte Sekretion aus den Weibel-Palade-Körperchen erfolgt durch Mediatoren wie Thrombin, Histamin, Zytokine, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und vasoaktive Hormone [65, 66]. Dabei werden zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege ausgelöst. Thrombin, Histamin, Zytokine und VEGF führen über einen noch unbekannten Mechanismus zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg. Vasoaktive Hormone wie Epinephrin und Vasopressin führen über einen Anstieg der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) – Konzentration zur Freisetzung des VWFs [50].

In Zellkultur-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie und hohe Scherkräfte die Sekretion verstärken [67]. Therapeutisch kann die Freisetzung des VWFs durch Desmopressin stimuliert werden, was unter anderem zur Therapie der von-Willebrand-Krankheit und der Hämophilie A genutzt wird [68]. Stickstoffmonoxid (NO) hemmt die VWF-Sekretion, wahrscheinlich auf Grund seiner Eigenschaft, die Aktivität verschiedener Membranfusionsproteine zu hemmen [50].

Die Sekretion erfolgt in Form ultralanger VWF Multimere. Diese werden unter Scherstress umgehend durch die Protease ADAMTS13 in der A2-Domäne zwischen den Aminosäuren Tyr1605 und Met1606 zu kleineren, weniger reaktiven Multimeren gespalten [9]. Die Größe der VWF Multimere im zirkulierenden Blut variiert zwischen 500 kDa und 20.000 kDa, wobei große Multimere hämostatisch aktiver sind als kleinere Multimere [40, 69]. Die kleinsten Spaltprodukte infolge der Proteolyse durch ADAMTS13 sind Homodimere mit einer Größe von 140 und 176 kDa. Allerdings konnten Homodimere mit einer Größe von 140 kDa im Blutplasma bisher nicht nachgewiesen werden [40].

### 1.2.3 FUNKTION

Der VWF spielt eine wichtige Rolle in der Hämostase, da er die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an verletztes Endothel vermittelt. Er interagiert einerseits mit den freigelegten Kollagenfibrillen der Gefäßwand und bindet andererseits Thrombozyten über die hochaffine Bindungsstelle in der A1-Domäne für den thrombozytären Glykoproteinrezeptor Ib-IX (Gp Ib-IX) [70]. Diese Thrombozyten-Bindungsstelle des VWFs wird erst nach Bindung der Kollagenfibrillen und unter hohen Scherkräften durch Konformationsänderungen des Moleküls frei [35]. Dadurch wird eine spontane Bindung des VWFs an die Membran zirkulierender Thrombozyten im Plasma verhindert.

Der VWF stellt somit eine Brücke zwischen verletztem Endothel und Thrombozyten dar. Damit die primäre Hämostase normal ablaufen kann, muss er in voll multimerisierter Form vorliegen. Fehlen die großen Multimere, kann die Brückenbildung nicht stattfinden [71, 72].

In der C1-Domäne besitzt der VWF eine weitere Bindungsstelle für den Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex der Thrombozyten. Dieser ist primär als Fibrin-/ Fibrinogen-Rezeptor aktiv und hat eine höhere Affinität zu Fibrin / Fibrinogen als zu VWF [73-75].

Eine weitere wichtige Funktion des VWFs ist die als Träger des Faktors VIII [45, 76]. Faktor VIII kommt im Blut zu ca. 95% gebunden an VWF vor wohingegen nur 1-5% frei im Plasma zirkulieren. Der VWF bindet Faktor VIII über eine Bindungsstelle in der D'-Domäne [56, 77]. Durch diese Bindung wird Faktor VIII vor dem proteolytischen Abbau geschützt und seine Halbwertszeit von 3 Stunden auf 12 bis 14 Stunden verlängert [45, 78]. Liegt die VWF Konzentration unter 30%, kann Faktor VIII nicht mehr stabilisiert werden, sodass es zu Störungen der Hämostase kommt.

Ein weiteres Protein, das VWF bindet, ist Osteoprotegerin. Dieses Protein wurde 1997 erstmals beschrieben. Es wird in Endothelzellen synthetisiert und bereits gebunden an VWF ins Plasma abgeben. Es scheint eine regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel zu haben [79].

Qualitative oder quantitative Veränderungen des VWFs führen zur von-Willebrand-Krankheit [80]. Hierbei handelt es sich um eine der häufigsten hämorrhagischen Diathesen, die durch Schleimhautblutungen, gastrointestinale Blutungen, Menorrhagien und verlängerte Blutungen nach Verletzungen und Operationen gekennzeichnet ist. Die von-Willebrand-Krankheit wird in 3 Typen unterteilt. Bei Typ 1 liegt ein quantitativer Defekt des VWFs vor, bei Typ 2 dagegen ein qualitativer Defekt

des VWFs. Bei der seltenen Typ 3 von-Willebrand-Krankheit fehlt der VWF komplett, sowohl im Plasma als auch in Thrombozyten [81].

### 1.3 THROMBOTISCHE MIKROANGIOPATHIEN

Unter den Thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) werden verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die sich durch die gemeinsamen Symptome einer hämolytischen Anämie und ausgeprägte Thrombozytopenie mit Organstörungen unterschiedlicher Schwere äußern [59, 82].

Die beiden Hauptvertreter der TMA sind die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) [59, 83]. Die Symptome einer TMA werden außerdem sehr häufig in Verbindung mit Schwangerschaft, Tumorerkrankungen, Chemotherapie, HIV-Infektionen, maligner Hypertension sowie in Folge einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation beobachtet. Es können alle Altersgruppen betroffen sein [82].

Die verschiedenen Formen der TMA werden anhand der klinischen Symptome sowie der pathophysiologischen Mechanismen unterschieden. Aufgrund der Überschneidung der klinischen Symptome ist die Differenzierung der TMA, insbesondere zwischen TTP und HUS, sehr schwierig [83]. Generell kann man sagen, dass HUS vermehrt bei Kindern auftritt und durch die Trias Thrombozytopenie, mikroangiopathische hämolytische Anämie und renale Dysfunktion charakterisiert ist. Die TTP hingegen stellt eine disseminierte Form der thrombotischen Mikroangiopathien dar, welche durch Thrombozytopenie, mikroangiopathische Hämolyse mit fragmentierten Erythrozyten und durch neurologische oder kardiologische Defizite gekennzeichnet ist [41].

Die TMA weisen eine hohe Heterogenität auf, besitzen jedoch einen gemeinsamen pathophysiologischen Auslösemechanismus: die Schädigung des Endothels mit gleichzeitiger Aktivierung desselben. Als Auslöser der Endothelschädigung kommen unterschiedliche Faktoren in Frage, unter anderem Infektionen, Medikamente, Immunkomplexe und Tumorzellen, aber auch viele weitere, zum Teil noch unbekannte, Faktoren [82].

Eine Möglichkeit der Einteilung der TMA ist die Einteilung nach der Grundursache der Erkrankung, wie in Tabelle 1 dargestellt ist.

## Einleitung

Tabelle 1: Einteilung der TMA nach der Grundursache der Erkrankung modifiziert nach Kiss [84]

| Primäre TMAs  | Sekundäre TMAs  |
|---|---|
| 1. Primäre TTP <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hereditär</li> <li>• Idiopathisch</li> </ul>  | 1. Autoimmunerkrankung, Vaskulitis  |
|   | 2. Medikamenten-induziert <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypersensitiv:<br/>Chinin, Ticlopidin, Clopidogrel</li> <li>• Dosisabhängig:<br/>Cyclosporin, Chemotherapie</li> </ul> |
| 2. Primäres HUS <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hereditär</li> <li>• Idiopathisch</li> </ul> | 3. Schwangerschaft / Wochenbett   |
|   | 4. HIV  |
|   | 5. In Verbindung mit Krebserkrankungen  |
|   | 6. In Verbindung mit Transplantationen:<br>allogene Stammzell-Transplantation   |
|   | 7. Shigatoxin-assoziiert<br>(E. coli 0157:H7) = "D+HUS"   |

Eine andere Möglichkeit der Einteilung der TMA erfolgt anhand labordiagnostischer Parameter, wobei die ADAMTS13-Aktivität eine wichtige Rolle spielt.

Tabelle 2: Einteilung der TMA anhand der ADAMTS13 Aktivität modifiziert nach Coppo und Veyradier [82]. HELLP: **H**aemolysis, **E**levated **L**iver enzyme levels, **L**ow **P**latelet count; APS: **A**ntiphospholipid **S**yndrom; HIT: **H**eparin-induzierte **T**hrombozytopenie; VOD: **v**eno-**o**clusive **d**isease / Venöse Verschlusskrankheit; DIG: **d**isseminierte intravasale **G**erinnung / Verbrauchskoagulopathie; HIV: **H**umanes Immundefizienz-**V**irus

| Schwere ADAMTS13 Defizienz  | Messbare ADAMTS13 Aktivität (HUS)  | Messbare ADAMTS13 Aktivität (andere)  |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primäre TTP <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hereditär</li> <li>○ Idiopathisch</li> </ul> </li> <li>• Sekundäre TTP <ul style="list-style-type: none"> <li>○ HIV</li> <li>○ Krebs</li> <li>○ Schwangerschaft / Wochenbett</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• HUS mit Enterobakterien (auch als „D+HUS“ bezeichnet)</li> <li>• Atypische HUS mit Komplement-Dysfunktion</li> <li>• mit Streptokokkus pneumoniae</li> <li>• mit Vitamin B12 Metabolismusstörungen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• andere TMA Syndrome</li> <li>• HIV</li> <li>• Krebs (meist disseminiert)</li> <li>• Medikamenteninduziert</li> <li>• „idiopathisch“</li> <li>• HELLP Syndrom</li> <li>• APS/ HIT/ VOD/</li> <li>• Schwere DIG</li> </ul> |

### 1.3.1 DIE THROMBOTISCH-THROMBOZYTOPENISCHE PURPURA (TTP)

Die TTP ist eine lebensbedrohliche Multisystemerkrankung, die durch hämolytische Anämie und Thrombozytopenie mit thrombotischer Verlegung der Endstrombahn charakterisiert ist [84]. Sie wurde 1924 durch den Arzt Eli Moschcowitz erstmals beschrieben [85]. Sie ist eine sehr schwere Form der TMA und endet unbehandelt in 90% der Fälle tödlich [86]. Durch die Anwendung des Plasmaaustauschs als Therapie der TTP ist die Mortalität auf 10 – 20% gesunken [87]. Die TTP wird mit einer Inzidenz von 3-10/mio als seltene Erkrankung eingestuft, ist aber nach heutigen Erkenntnissen nur viel zu selten diagnostiziert [59]. Unterschieden wird zwischen primärer und sekundärer TTP, wobei die primäre Form nochmals in die hereditäre und die idiopathische Form unterteilt wird.

#### 1.3.1.1 GESCHICHTLICHER HINTERGRUND

Der Arzt Eli Moschcowitz beschrieb 1924 erstmals das Krankheitsbild eines 16-jährigen Mädchens, das infolge abrupten Auftretens petechialer Hauteinblutungen, Anämie, Fieber und neurologischen Störungen in das Mount Sinai Hospital in New York City eingeliefert wurde. Durch das rasche Fortschreiten der Erkrankung starb das Mädchen bereits nach 2 Wochen an der Erkrankung. In der Autopsie konnten multiple hyaline Thromben nachgewiesen werden, die ausschließlich in terminalen Arteriolen und Kapillaren auftraten. Später konnte gezeigt werden, dass diese Mikrothromben hauptsächlich aus Thrombozyten und VWF bestanden. Moschcowitz vermutete

## Einleitung

damals, dass ein starker Giftstoff, welcher sowohl agglutinierende als auch hämolytische Eigenschaften hat, die Erkrankung auslöste [85].

Amorosi und Ultmann fassten 1966 in einer Veröffentlichung 250 Fälle von TTP-Patienten zusammen und entwickelten dabei eine Pentade klinischer und labordiagnostischer Parameter zur Diagnose der TTP: mikroangiopathische hämolytische Anämie mit fragmentierten Erythrozyten (auch Fragmentozyten oder Schistozyten genannt) im Blutaussstrich sowie Thrombozytopenie, Fieber, neurologische Störungen und renale Dysfunktion [86]. Diese Kriterien werden auch heute noch als wichtige Anhaltspunkte für die Diagnose einer TTP angesehen, wobei die Triade Thrombozytopenie, Fragmentozyten im Blutaussstrich und stark erhöhte Serum-LDH Werte mittlerweile ausreichen, um den Verdacht einer TTP zu erheben [88].

Nachdem über 50 Jahre nach der Erstbeschreibung der TTP die Mortalität der Erkrankung bei fast 100% lag, berichteten Pisciotta et al. 1977 von drei Patienten, welche mit Plasmaaustauschtherapie behandelt wurden [89]. Diese zeigte deutliche Erfolge und im selben Jahr wurde eine Plasma-basierte Therapie als „Durchbruch“ in der Behandlung der TTP angesehen. Der Plasmaaustausch ist auch heute noch Goldstandard bei der Therapie der TTP.

Der Zusammenhang der Erkrankung mit UL VWF Multimeren wurde 1982 von Moake et al. beschrieben [38]. Diese konnten in Plasmaproben von vier Patienten mit familiärer, chronisch-rezidivierender TTP UL VWF Multimere nachweisen. Sie vermuteten, dass diese die Auslöser der systemischen Thrombozytenbindung an UL VWF darstellen und dass Patienten mit chronisch-rezidivierender TTP möglicherweise einen Defekt im Abbau der Multimere aufweisen. Diese Hypothese konnte von Furlan et al. und Tsai in den darauf folgenden Jahren bestätigt werden [8, 90-92]. 1996 entdeckten Furlan und Tsai unabhängig voneinander die VWF-spaltende Protease und entwickelten Tests zum Nachweis dieser. Sie berichteten davon, dass in den akuten Phasen der Erkrankung die Aktivität der VWF-spaltenden Protease nicht bzw. kaum messbar ist. Außerdem konnten 1998 bei der Untersuchung eines Patienten mit sehr niedriger Aktivität der VWF-spaltenden Protease, IgG Antikörper gegen diese nachgewiesen werden, welche zur Proteasedefizienz führten [92].

2001 konnten Zheng et al. die Aminosäuresequenz der VWF-spaltende Protease aufklären und Levy et al. identifizierten das dazu gehörige Gen. Heute wird die VWF-spaltende Protease als ADAMTS13 bezeichnet [11, 12, 93].

### 1.3.1.2 PATHOPHYSIOLOGIE

Histologisch ist die TTP gekennzeichnet durch das Auftreten von Thrombozyten und von Willebrand Faktor-reichen Mikrothromben in den Arteriolen und Kapillaren verschiedener Organsysteme, insbesondere in Gehirn, Herz, Niere, Pankreas, Milz, Mesenterium und Nebenniere [94, 95]. Einer der wichtigsten dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist ein Defekt in der Regulation der Aktivität des VWFs. Wichtigster Mediator ist hierbei die Protease ADAMTS13.

Bei der TTP kommt es an Orten mit hohem Scherstress, aufgrund einer reduzierten ADAMTS13-Aktivität, zur Ansammlung hoch reaktiver UL VWF Multimere. Es bilden sich multiple hyaline Mikrothromben, die vor allem aus Thrombozyten und VWF bestehen und schließlich zu einer Verlegung der Endstrombahn führen (Abbildung 4). Überdies kommt es in den betroffenen Bereichen zu einer Endothelschädigung und mechanischen Zerstörung der Erythrozyten, was schließlich in einer extrakorpuskularen hämolytischen Anämie sowie in Ischämien der betroffenen Organe endet [40].

Diese pathophysiologischen Vorgänge führen zu den in der Klinik beobachteten Symptomen der TTP, welche je nach betroffenen Organen sehr unterschiedlich sein können [40].

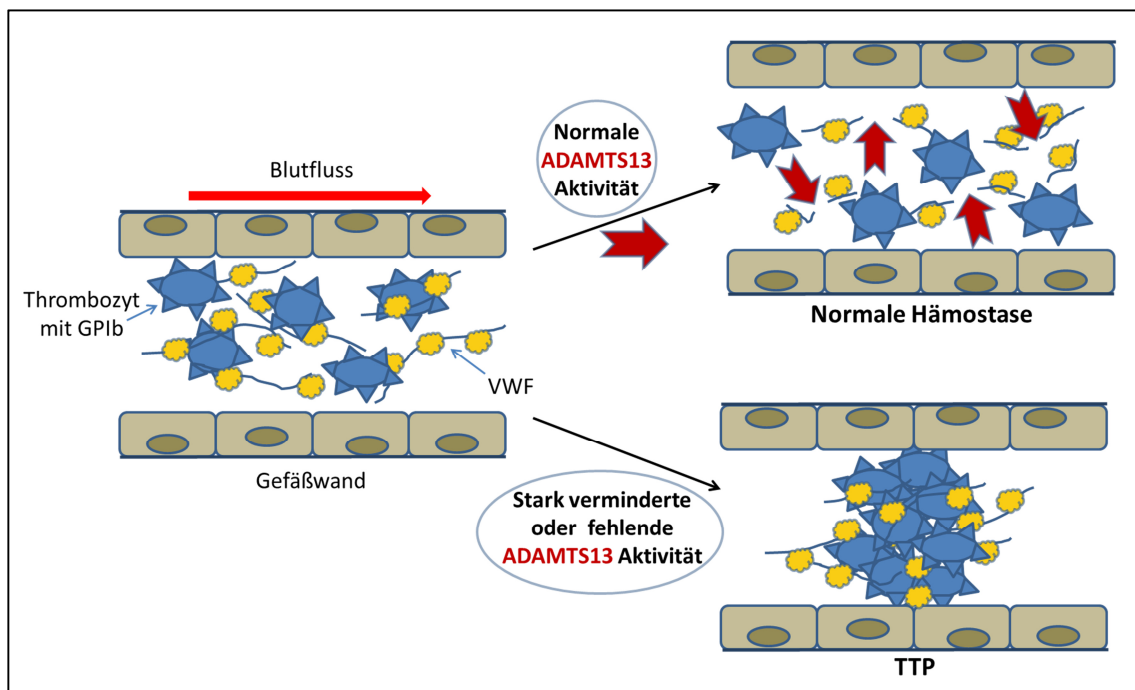


Abbildung 4: Pathophysiologie der primären TTP modifiziert nach Hellmann, Hallek, Scharrer [96].

### **1.3.1.3 TYPISIERUNG**

Wie bereits erwähnt, wird zwischen einer primären TTP und einer sekundären TTP unterschieden. Ausgangspunkt dieser Einteilung ist die ADAMTS13 Aktivität. Diese ist bei der primären TTP stark erniedrigt und teilweise auch nicht mehr messbar, wo hingegen bei der sekundären TTP die ADAMTS13 Aktivität normal oder nur leicht erniedrigt sein kann. Die primäre TTP wird zusätzlich in hereditär und idiopathisch unterteilt [96].

Der hereditären Form, die auch als Upshaw-Schulman-Syndrom bezeichnet wird, liegt ein angeborener ADAMTS13 Mangel infolge von Genmutationen zugrunde [97]. Mittlerweile sind über 130 Genmutationen bekannt, die diesen Mangel auslösen können [12, 40, 96, 98-100]. Die Erkrankung manifestiert sich meist in den ersten drei Lebensjahrzenten.

Die idiopathische Form ist durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen ADAMTS13 gekennzeichnet. Diese binden hauptsächlich an die cysteinreiche Region der ADAMTS13 und führen so zum Aktivitätsverlust der Protease [101].

Sekundäre Formen der TTP können durch eine Vielzahl von Erkrankungen oder Medikamente ausgelöst werden. Als medikamentöse Auslöser sind unter anderem Medikamente aus der Gruppe der Thienopyridine, Chemotherapeutika und Calcineurininhibitoren beschrieben [102]. Insbesondere immunologische Erkrankungen sowie Schwangerschaft und die Wochenbettphase können zur Entwicklung einer sekundären TTP führen [103].

### **1.3.1.4 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD UND DIAGNOSE**

Die TTP äußert sich klinisch zunächst durch eine Thrombozytopenie unterschiedlichen Schweregrads mit einer Coombs-negativen hämolytischen Anämie. Die Hämolyseparameter Haptoglobin, Laktatdehydrogenase (LDH) und indirektes Bilirubin liegen im pathologischen Bereich. Im peripheren Blutaussstrich ist ein deutlich erhöhter Fragmentozytenanteil kennzeichnend, welcher in Folge einer mechanischen Schädigung der Erythrozyten aufgrund der Endothelverletzung und Mikrothrombenbildung auftritt [96].

Ischämiebedingte Organausfälle betreffen vor allem Herz und Gehirn und äußern sich klinisch unter anderem in Halluzinationen, sensomotorischen Ausfällen, Koma, Desorientiertheit und kardialen Beschwerden [104].

Hinzu kommt häufig noch Fieber, welches durch die Zytokinfreisetzung in Folge der Verletzung und Mikrothrombosierung der kleinen Gefäße ausgelöst wird [96].



Tabelle 3: Klinische und labordiagnostische Parameter zur Diagnose der TTP nach Hellmann [96]

| <b>Klinische Konstellation bei thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura</b>   |   |
|--|---|
| Laborparameter   | Symptome  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Haptoglobin erniedrigt</li> <li>• LDH erhöht</li> <li>• Bilirubin indirekt erhöht</li> <li>• Freies Hämoglobin erhöht</li> <li>• Fragmentozyten &gt; 15 ‰ im Blutaussstrich</li> <li>• Kreatinin erhöht</li> <li>• Thrombozytopenie</li> <li>• Anämie</li> <li>• Proteinurie/Hämaturie</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopfschmerzen</li> <li>• Vigilanzstörungen</li> <li>• Fokale neurologische Defizite</li> <li>• Petechiale Blutungen</li> <li>• Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö</li> <li>• Abdominale Schmerzen</li> <li>• Fieber</li> </ul> |

Die Diagnose der primären TTP erfolgt als Ausschlussdiagnose, wenn eine mikroangiopathische hämolytische Anämie mit Thrombozytopenie nachgewiesen werden kann, andere Ursachen einer sekundären TTP jedoch fehlen [87]. Die Messung einer verminderten oder sogar fehlenden ADAMTS13-Aktivität sowie das Vorkommen von UL VWF Multimeren im Plasma, bestätigen die Verdachtsdiagnose einer primären TTP. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen ADAMTS13 erlaubt die Differenzierung zwischen primär hereditär und idiopathisch [72].

Bei der sekundären TTP ist die ADAMTS13-Aktivität häufig nur gering vermindert.

#### **1.3.1.5 THERAPIE**

Durch Einführung des Plasmaaustauschs als Therapie der TTP 1977 konnte die Mortalität der Erkrankung von 90% auf 10 – 20% gesenkt werden [89]. Auch heute noch ist der Plasmaaustausch mittels Plasmapherese Therapiestandard in der Behandlung der TTP [87, 105, 106]. Dies erfolgt durch Anwendung von Fresh Frozen Plasma (FFP), welches im Volumenbereich von 8-10 FFP gegeben wird, wobei 1 FFP 190-250 ml enthält. Die Therapie muss solange fortgeführt werden, bis sich Thrombozytenzahl und LDH über 2 Tage normalisiert haben [96].

Ziel dieser Therapie ist einerseits die Zuführung von ADAMTS13 und andererseits die Elimination der Autoantikörper gegen ADAMTS13 und der UL VWF Multimere im Plasma.

Da es sich bei der TTP um einen hämatologischen Notfall handelt, sollte die Therapie so schnell wie möglich, bereits bei Verdachtsdiagnose, begonnen werden. Ist die Möglichkeit des Plasmaaustauschs nicht gegeben, so muss zunächst mit einer Plasmatransfusion von 15-30 ml/kg begonnen werden. In klinischen randomisierten

## Einleitung

Studien wurde nachgewiesen, dass der Plasmaaustausch der Plasmatransfusion überlegen ist, sodass TTP-Patienten schnellst möglich an ein hämatologisches Zentrum mit Hämaphereseeinheit überwiesen werden sollten [87].

Bei starker Anämie ist die Gabe von Erythrozytenkonzentrat sinnvoll, um ischämiebedingte Organschäden zu vermeiden [96]. Die Wirksamkeit von Kortikosteroiden zur Unterdrückung der Autoantikörperbildung konnte zwar in randomisierten, kontrollierten Studien noch nicht belegt werden, einige Fallberichte deuten jedoch darauf hin [105]. Die Splenektomie wurde schon vor der Entdeckung von ADAMTS13 zur Behandlung von TMA durchgeführt. Sie stellt auch heute noch eine Therapiemöglichkeit der TTP dar [107]. Insbesondere bei Patienten mit hohen Rezidivraten konnte eine Verbesserung durch Splenektomie erzielt werden und die Häufigkeit der Rückfälle von 2,3 Ereignissen pro Jahr auf 0,1 Ereignisse pro Jahr gesenkt werden [108]. Jedoch ist die Rezidivfreiheit meist auf 6 Jahre beschränkt.

Der Einsatz von Rituximab stellt eine vielversprechende Therapiemöglichkeit bei primärer TTP dar. Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der gegen das B-Lymphozyten spezifische Oberflächenprotein CD20 gerichtet ist. Rituximab wurde schon wirksam bei anderen Autoimmunerkrankungen eingesetzt und auch bei TTP konnte bei therapie-refraktären Patienten nach Plasmapherese und immunsuppressiver Behandlung ein Therapieansprechen gezeigt werden [109, 110]. Randomisierte, kontrollierte, klinische Studien zum Einsatz von Rituximab bei der primären TTP wurden jedoch wegen zu geringen Rekrutierungsraten inzwischen abgesetzt [111, 112].

Außerdem wurde das Aptamer ARC1779, das sehr spezifisch und potent die Aktivität des VWF unterdrückt, bereits bei TTP-Patienten getestet [113]. ARC1779 ist ein kleines Oligonukleotid, das an die A1 Domäne des VWF bindet und somit die Bindung zwischen VWF und dem Glykoprotein 1b der Thrombozyten verhindert. In einer klinischen Studie wurde es unter anderem erfolgreich bei einem Patienten mit zunächst therapie-refraktärer TTP eingesetzt. Unter der Behandlung mit ARC1779 konnte ein deutlicher Anstieg der Thrombozytenzahl erreicht werden [114]. Somit scheint es sich hierbei um einen neuen, vielversprechenden Stoff zur Therapie der TTP zu handeln.

In Mausmodellen für TTP wurde außerdem das bei chronisch obstruktiver Bronchitis eingesetzte Medikament N-Acetylcystein (NAC) getestet. NAC spaltet Muzin Multimere, die ähnlich wie UL VWF Multimere polymerisieren. Die Injektion von NAC in ADAMTS13-defiziente Mäuse führte zu einer raschen Auflösung der zuvor mittels

Kalzium-Ionophor-Behandlung ausgelösten Mikrothromben sowie zu einer Abnahme der UL VWF Multimere im Plasma dieser Tiere [115].

Auch eine Zell-basierte Gentherapie wurde schon erfolgreich bei ADAMTS13-defizienten Mäusen durchgeführt [116, 117].

### 1.3.1.6 PROGNOSE

Mit Einführung der Plasmaaustauschtherapie als Standardtherapie der TTP sank die Mortalität von 90% auf 10 – 20% [89]. Allerdings handelt es sich bei der TTP um eine schubartig verlaufende Krankheit, sodass immer wieder akute Schübe auftreten können. Die Häufigkeit der Schübe ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich und auch die Abstände zwischen den Schüben differieren stark [118]. Patienten mit einer stark verringerten ADAMTS13 Aktivität ( $\leq 10\%$ ) während der Remission haben ein dreifach höheres Rückfallrisiko im Vergleich zu Patienten mit höheren ADAMTS13 Aktivitäten während der Remission [119, 120]. Ein Zusammenhang zwischen anti-ADAMTS13-Antikörpern und erhöhter Rückfallrate konnte ebenfalls nachgewiesen werden [120, 121]. Abgesehen davon, dass sich die klinischen Symptome der TTP während der Remission bei den meisten Patienten weitgehend normalisieren, leiden viele TTP Patienten unter dauerhaften Angststörungen, Depressionen und neurokognitiven Defiziten [118].

## 1.4 ADAMTS13-DEFIZIENTE MÄUSE ALS MODELL DER ANGEBORENEN TTP

Zur weiteren Erforschung der Funktion von ADAMTS13 sowie der Erkrankung TTP haben zwei unabhängige Arbeitsgruppen Adamts13-defiziente Mäuse (*Adamts13*<sup>-/-</sup>) gezüchtet. Die Arbeitsgruppe von Banno et al. [2] züchtete *Adamts13*<sup>-/-</sup> Mäuse mit einem 129/Sv Hintergrund durch Austausch der Exone 3-6 des *Adamts13*-Gens mit einer Neomycin-Resistenz-Kassette. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, haben 129/Sv Mäuse die komplette Form von Adamts13 (*Adamts13L*), mit einer identischen Domänen Organisation wie die humane ADAMTS13 [27]. Die Arbeitsgruppe von Motto et al. [1] züchtete die *Adamts13*<sup>-/-</sup> Mäuse zunächst auf einem gemischtem C57BL/6J und 129/Sv Hintergrund durch Austausch der Exone 1-6 des *Adamts13*-Gens mit einer Neomycin-Resistenz-Kassette. Diese Mäuse wurden dann weiter mit CASA/Rk Mäusen gekreuzt. CASA/Rk Mäuse haben physiologisch 5 – 10-mal höhere VWF Konzentrationen im Blut als C57BL/6 und 129/Sv Mäuse.

Beide Gruppen konnten zeigen, dass die *Adamts13*<sup>-/-</sup> Mäuse keine nachweisbare Adamts13 Aktivität mehr im Plasma hatten. Die Mäuse waren lebensfähig und fertil und die Nachkommen beider *Adamts13*<sup>-/-</sup> Mäuse (mit 129/Sv und gemischtem 129/Sv und

## Einleitung

C57BL/6J Hintergrund) zeigten die erwartete Geschlechterverteilung 1:2:1 nach den Mendelschen Gesetzen. In hämatologischen und histologischen Untersuchungen konnten keinerlei Anzeichen einer TTP nachgewiesen werden. Die Mäuse entwickelten keine Thrombozytopenie, keine hämolytische Anämie und mikrovaskuläre Thrombosen in Niere, Herz und Gehirn waren auch nicht nachweisbar [1, 2]. Nach Rückkreuzung der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit gemischtem Hintergrund mit den CASA/Rk Mäusen über zwei Generationen zeigten einzelne Mäuse spontan TTP-typische Symptome. Sie entwickelten eine schwere Thrombozytopenie, hämolytische Anämie mit Fragmentozyten im Blutausschlag, VWF-reiche und Fibrin-arme hyaline Mikrothromben in Gehirn, Herz und Niere und starben früher als Wildtyp Mäuse [1].

Im Plasma der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit 129/Sv Hintergrund waren UL VWF Multimere vorhanden, die bei den Wildtyp Kontrollen nicht vorlagen [2]. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit gemischtem Hintergrund zeigten dagegen keinen Unterschied im Multimermuster im Vergleich zu ihren Kontrollmäusen. Sowohl die Knockout als auch die Wildtyp Mäuse hatten UL VWF Multimere im Plasma. Erst nach Rückkreuzung mit CASA/Rk Mäusen waren Unterschiede im Multimermuster, vergleichbar mit TTP beim Menschen, nachweisbar [1].

Beide Forschungsgruppen konnten in unterschiedlichen *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen einen prothrombotischen Status der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse nachweisen. Banno et al. [2] zeigten dies durch eine größere Thrombusbildung im Vollblut der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse in einer mit Kollagen-beschichteten Flusskammer sowie durch einen erhöhten Thrombozytenverbrauch nach Injektion von Kollagen plus Epinephrin in die Schwanzvenen der Mäuse. Motto et al. [1] und Chauhan et al. [122] untersuchten die VWF-bedingte Thrombozyten-Endothel-Interaktion in Venolen der Mesenterialgefäße und beobachteten hier längere VWF-Stränge sowie eine verlängerte Thrombozytenadhäsion an VWF bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Beide Gruppen kamen somit übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass eine ADAMTS13-Defizienz zwar notwendig, nicht aber ausreichend ist, um eine TTP auszulösen und dass sich die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse sehr gut zur Untersuchung von Triggerfaktoren der TTP eignen.

Zwei Triggerfaktoren der TTP in Mäusen wurden bereits gefunden und untersucht. Shigatoxin (Stx), was toxisch auf das Endothel wirkt, löste in den mit CASA/Rk zurückgekreuzten Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen eine starke Thrombozytopenie, hämolytische Anämie und die Bildung von Mikrothrombosen in kleinen Gefäßen verschiedener Organe aus. In Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen mit gemischten C57BL/6J und 129/Sv Hintergrund zeigte Stx dagegen keine TTP-typischen Veränderungen. Ein Zusammenhang

## Einleitung

zwischen den VWF-Konzentrationen der Mäuse und ihrer Anfälligkeit für TTP konnte nicht nachgewiesen werden [1].

Die Injektion von hochdosiertem (2000 VWF:RCoU/kg Körpergewicht) rekombinantem humanem VWF (rhVWF) in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit gemischtem C57BL/6J und 129/Sv Hintergrund führte innerhalb weniger Minuten zu einer starken Thrombozytopenie, einem Abfall des Hämatokrits und Anstieg der Laktat Dehydrogenase. Im Blutaussstrich der Mäuse waren Fragmentozyten nachweisbar. Histologische Untersuchungen zeigten Myokardnekrosen und Thrombozytenaggregate im Herzen. Mikrothrombosen in Gehirn und Niere, vergleichbar mit TTP beim Menschen, konnten dagegen nicht nachgewiesen werden [123].

Eine Zusammenfassung der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse als Modell zur Untersuchung der angeborenen TTP ist in Tabelle 4 dargestellt. Neben dem prothrombotischen Status der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wurde auch ein proinflammatorischer Status in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen mit gemischten C57BL/6J und 129/Sv Hintergrund festgestellt. Dieser zeigte sich durch ein erhöhtes Rollen von Leukozyten in unstimulierten Mesenterialgefäßen und eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten in TNF- $\alpha$ -stimulierten Venolen der Mesenterialgefäße. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Bauchhöhle nach Thioglykollat-induzierter Peritonitis war bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden Wildtyp Mäusen. In einem Entzündungsmodell der Haut war dies ebenfalls zu beobachten [124]. In verschiedenen Mausmodellen für Herzinfarkt [125, 126], Schlaganfall [127-130] und Artherosklerose [131, 132] konnte der proinflammatorische Status dieser Mäuse weiter bestätigt werden.

## Einleitung

Tabelle 4: Übersicht der Mausmodelle für die Untersuchung der angeborenen TTP

| Mausstamm  | C57BL/6J x 129/Sv   | C57BL/6J -129/Sv x CASA/Rk   | 129/Sv  |
|--|---|--|---|
| <b>Adamts13 Protein</b>                              | Adamts13 S  | Adamts13 L   | Adamts13 L  |
| <b>Physiologische VWF:AG Konzentration im Plasma</b> | VWF:AG normal   | VWF:AG ↑↑↑ (5-10fach erhöht)   | VWF:AG normal   |
| <b>Multimermuster</b>                                | UL-VWF +  | UL-VWF -   | UL-VWF -  |
| <b>Adamts13<sup>-/-</sup> Phänotyp</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>keine Adamts13 Aktivität</li> <li>UL-VWF +</li> <li>keine TTP</li> <li>prothrombotischer Status [1]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>keine Adamts13 Aktivität</li> <li>UL-VWF +</li> <li>teilweise spontane Entwicklung einer TTP [1]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>keine Adamts13 Aktivität</li> <li>UL-VWF +</li> <li>keine TTP</li> <li>prothrombotischer Status [2]</li> </ul> |
| <b>Shigatoxin als Triggerfaktor</b>                  | Keine TTP Entwicklung [1]   | TTP [1]  | Nicht untersucht  |
| <b>rhVWF als Triggerfaktor</b>                       | TTP [123]   | Nicht untersucht   | TTP (siehe Kapitel 5.3)   |

## 2 MÄUSE UND MATERIALIEN

### 2.1 MÄUSE

Die in dieser Arbeit verwendeten **Adamts13-defizienten Mäuse (Adamts13<sup>-/-</sup>)** wurden als eingefrorene Embryonen aus Japan von NIBIO (National Institute of Biomedical Innovation) bezogen. Die Revitalisierung der Embryonen wurde in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz durchgeführt. Die weitere Zucht und Haltung erfolgte ebenfalls in den Einrichtungen der ZVTE.

Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wurden erstmals von Banno et al. 2006 in Japan gezüchtet und beschrieben [2]. Bei diesen Mäusen wurden die Exone 3-6 des *Adamts13* Gens, welche für die katalytische Domäne der ADAMTS13 Protease kodieren, durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Dies wurde in embryonalen Stammzellen durchgeführt, die von Mäusen mit einem 129/Sv Hintergrund stammten. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wurden dann weiter auf einen 129/Sv genetischen Hintergrund über 10 Generationen zurück gekreuzt.

Für die entsprechenden **129/Sv Wildtyp Kontrollmäuse** wurden von Charles River zwei Zuchtpaare (129S2/Sv Pas CRL) bezogen und ebenfalls weitere Nachkommen in den Einrichtungen der ZVTE gezüchtet und gehalten.

Als Versuchstiere wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse in einem Alter von 8–16 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von  $25 \pm 5$  g verwendet. Die Tierversuche wurden nach den allgemein gültigen Gesetzen und Verordnungen zum Tierschutz, Tierschutzgesetz (TierSchG), fünfter Abschnitt, Tierversuche § 7-9 durchgeführt. Der Tierversuchsantrag wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter der Nummer G 11-1-024 und mit der Kurzbezeichnung ADAMTS13/TTP genehmigt.

## 2.2 MATERIALIEN

### 2.2.1 ANTIKÖRPER

In Tabelle 5 sind alle Antikörper aufgelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Antikörper

| Antigen                       | Spezifität | Monoklonal/<br>Polyklonal<br>(Spezies) | Klon<br>Name | Konju-<br>gation | Bezugsquelle                    |
|-------------------------------|------------|--|--------------|------------------|---------------------------------|
| Von Willebrand Faktor         | Human      | Polyklonal<br>(Kaninchen)              | A 0082       | -                | Dako-<br>Cytomation<br>Dänemark |
| Von Willebrand Faktor         | Human      | Polyklonal<br>(Kaninchen)              | P 0226       | HRP              | Dako-<br>Cytomation<br>Dänemark |
| Kaninchen Immun-<br>globuline | Kaninchen  | Polyklonal<br>(Ziege)                  | D 0487       | AP               | Dako-<br>Cytomation<br>Dänemark |
| ADAMTS13                      | Human      | Polyklonal<br>(Ziege)                  | -            | -                | Baxter<br>Innovations<br>GmbH   |

### 2.2.2 PRIMER

Alle Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden und in Tabelle 6 aufgelistet sind, wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden in dd H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 100 µM gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die PCR erfolgte eine weitere Verdünnung der Primer auf 10 µM.

Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung der Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse

| Name des Primers | Sequenz                                  | Funktion             |
|------------------|--|----------------------|
| Adamts 5'F       | 5'-ACC CTA TCT CTG GCC TGT<br>ATT CCT-3' | Genotypisierungs PCR |
| Adamts 5'R1      | 5'-TAC TGA CTT GTG ACC ACA<br>AGC CCT-3' | Genotypisierungs PCR |
| Adamts 5'R2      | 5'-ATC GAG TCT AGC TTG GCT<br>GGA CGT-3' | Genotypisierungs PCR |
| mouAdamts13_for  | 5'-ACT GTT GAG AAA CCC ATC<br>CCT-3'     | qRT-PCR              |
| mouAdamts13_rev  | 5'-TTG GCC GTG ATA TTC GGA<br>GTA-3'     | qRT-PCR              |



| Name des Primers | Sequenz                              | Funktion |
|------------------|--------------------------------------|----------|
| L32_for          | 5'-CCT CTG GTG AAG CCC<br>AAG ATC-3' | qRT-PCR  |
| L32_rev          | 5'-TCT GGG TTT CCG CCA GTT<br>T-3'   | qRT-PCR  |

### 2.2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial   | Firma                                 |
|--|---------------------------------------|
| Handschuhe Latex   | Sempercare                            |
| Handschuhe Nitril  | Sempercare                            |
| Mikrotiterplatte, 96-well<br>(Maxisorp und unbehandelt, transparent<br>und weiß, Flach- und Rundboden) | NUNC                                  |
| PCR-Reaktionsgefäße für<br>Genotypisierung   | Axon Labortechnik                     |
| PCR Reaktionsgefäße für RT-PCR, 96-<br>well  | BioRad                                |
| Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml  | Sarstedt AG & Co.                     |
| Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)<br>10µl, 200µl, 1000µl   | Star Lab und<br>epT.I.P.S.® Eppendorf |
| Micro-Haematokritröhren, Na-<br>heparinisiert<br>DIN ISO 12772   | Assistent                             |
| Microvette® CB 300 K2E Kalium-EDTA   | Sarstedt                              |
| S-Monovetten® Citrat 3,13%   | Sarstedt                              |
| Objektträger, Menzel Gläser, 76 x 26 mm  | Thermo Scientific                     |

**2.2.4 CHEMIKALIEN**

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Chemikalienliste

| <b>Name</b>  | <b>Firma</b>                             |
|--|--|
| Adrenalin 1:1000   | Jenapharm                                |
| SeaKem® HGT(P) Agarose   | Lonza                                    |
| Agarose LGT Typ VII, 2-Hydroxyethylagarose,  | Sigma Aldrich                            |
| Agarose StarPure (N3101-0500)  | STARLAB GmbH                             |
| Aqua B. Braun Spüllösung   | Braun                                    |
| Bariumchlorid  | Carl Roth                                |
| Bis-Tris, >99,0%   | Carl Roth                                |
| Bovines Serumalbumin   | Carl Roth                                |
| Calcium Ionophore A23187   | Abcam                                    |
| Calciumchlorid   | Carl Roth                                |
| Chininhydrochlorid-Dihydrat  | Merck                                    |
| Chromatography Paper 2 CHR/46x57cm<br>(0,18mm)   | Whatman                                  |
| Diaminobenzidin (DAB)  | Carl Roth                                |
| di-Natriumhydrogen-phosphat dihydrat ≥99.5 %, p.a.   | Carl Roth                                |
| DMSO   | Sigma Aldrich                            |
| EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x 2H <sub>2</sub> O) | Carl Roth                                |
| Essigsäure 100 %   | Carl Roth                                |
| Ethanol  | Carl Roth                                |
| Filterpapier 35x45 Model 583 Gel Dryer   | BioRad                                   |
| FRETs-VWF73  | PeptaNova                                |
| GelRed™ Nucleic Acid stain   | Biotrend Chemikalien GmbH                |
| Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung  | Merck                                    |
| Glycin >99,9% CELLPURE®  | Carl Roth                                |
| Histamin Dihydrochlorid  | AppliChem                                |
| Histone (aus Kälber Thymus), lyophilisiert   | CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH |

## Mäuse und Materialien

| Name   | Firma                       |
|--|-----------------------------|
| Ketamin–Hameln (50mg/ml)   | Hameln Pharmaceuticals GmbH |
| Kollagen Reagens HORM®   | Nycomed                     |
| Lipopolysaccharide von E.coli 055:B5 (LPS)   | Sigma                       |
| LumiGLO® Reagent 20X and 20X Peroxide  | Cell Signaling              |
| Magnesiumchlorid   | Carl Roth                   |
| May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung   | Merck                       |
| Mercaptoethanol 99 %, p.a.   | Carl Roth                   |
| Methanol   | Carl Roth                   |
| Natriumchlorid >99,9% CELLPURE®  | Carl Roth                   |
| Natriumdihydrogen-phosphat   | Carl Roth                   |
| Natronlauge  | Carl Roth                   |
| Nitrocellulosemembran Trans-Blot® Transfer Medium                                  | BioRad                      |
| Phosphatpuffer PBS ohne Calcium und Magnesium                                      | Invitrogen                  |
| Positivkontrolle des ACTIFLUOR™ ADAMTS13 activity kits                             | American Diagnostica GmbH   |
| Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazin)  | Bayer                       |
| Roti®-Histofix 4%  | Carl Roth                   |
| Salzsäure  | Carl Roth                   |
| SDS  | Carl Roth                   |
| SIGMA FAST™ BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) | Sigma Aldrich               |
| Tetramethylbenzidine Liq. Subs.  | Sigma Aldrich               |
| TRIS   | Carl Roth                   |
| Tris HCl   | Carl Roth                   |
| Triton® X-100  | Carl Roth                   |
| Tween 20 Molecular biology grade   | Carl Roth                   |
| Wasserstoffperoxid 30%   | Carl Roth                   |

## 2.2.5 PUFFER

Tabelle 9 listet die für diese Arbeit verwendeten Puffer.

Tabelle 9: Puffer

| Name                                  | Details   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Genotypisierungs PCR</b>           |   |
| Lysispuffer                           | 25 mM NaOH<br>0,2 mM EDTA<br>pH 12  |
| Neutralisationspuffer                 | 40 mM Tris-HCl<br>pH 5  |
| 50-fach Tris-EDTA-Acetat Puffer (TAE) | 2 M Tris<br>100 mM EDTA<br>pH 8 mit konzentrierter Essigsäure einstellen                      |
| 1-fach TAE Puffer                     | 20 ml 50-fach TAE<br>980 ml dd H <sub>2</sub> O   |
| 1,5% Agarosegel                       | 1,5 g Agarose (StarPure)<br>100 ml TAE-Puffer<br>2 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10000x) |
| <b>FRETS-Assay</b>                    |   |
| Reaktionspuffer                       | 5 mM Bis-Tris<br>25 mM CaCl <sub>2</sub><br>0,005% Tween-20<br>pH 6,0                         |
| <b>VWF Multimeranalyse</b>            |   |
| Trenngelpuffer                        | 1% SDS<br>0,75 M Tris-HCl<br>pH 8,8   |
| 1% Trenngel                           | 400 mg Agarose (Sigma, Typ VII)<br>40 ml Trenngelpuffer                                       |
| Sammelgelpuffer                       | 1% SDS<br>0,125 M Tris-HCl<br>pH 6,8  |
| 0,75% Sammelgel                       | 187,5 mg Agarose (Seakam, HGT(P))<br>25 ml Sammelgelpuffer                                    |
| 2-fach Probenpuffer                   | 2% SDS<br>20 mM Tris<br>2 mM EDTA<br>pH 8,0   |

## Mäuse und Materialien

| Name                 | Details   |
|----------------------|---|
| 1-fach Probenpuffer  | 2% SDS<br>10 mM Tris<br>1 mM EDTA<br>pH 8,0   |
| Bromphenolblaulösung | 0,2% Bromphenolblau<br>2% SDS<br>20 mM Tris<br>2 mM EDTA<br>pH 8,0  |
| Elektrophoresepuffer | 0,1% SDS<br>50 mM Tris<br>384 mM Glycin   |
| Blotpuffer           | 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Lösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ )  |
| Waschpuffer          | 20 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>0,1% Tween-20<br>pH 7,6  |
| Blockpuffer          | 3% BSA<br>20 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>0,1% Tween-20<br>pH 7,6  |
| <b>VWF ELISA</b>     |   |
| Coating-Puffer       | 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$<br>pH 9,3  |
| Waschpuffer          | 137 mM NaCl<br>2,7 mM KCl<br>10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$<br>2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,2% Tween-20<br>pH 7,4           |
| Blockpuffer          | 1% BSA<br>137 mM NaCl<br>2,7 mM KCl<br>10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$<br>2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,2% Tween-20<br>pH 7,4 |

### 2.2.6 KITSYSTEME

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Kitsysteme nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 10: Kitsysteme

| Name                                      | Firma   | Funktion                                       |
|---|---|--|
| HotStarTaq Plus Master Mix Kit            | QIAGEN<br>(Hilden, Deutschland)               | Amplifikation von DNS für Genotypisierungs-PCR |
| RNeasy Mini Kit                           | QIAGEN<br>(Hilden, Deutschland)               | Isolierung von RNS aus Gewebe                  |
| RNase-Free DNase Set                      | QIAGEN<br>(Hilden, Deutschland)               | DNase Verdau während RNS Isolation             |
| High Capacity cDNA Reverse Transcript Kit | Life Technologies<br>(Darmstadt, Deutschland) | Erzeugung von cDNA aus RNS                     |
| iQ™ SYBR® Green Supermix                  | BIO RAD<br>(München, Deutschland)             | Amplifikation von cDNA für qRT-PCR             |

### 2.2.7 GERÄTE

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Geräte

| Name                    | Firma  |
|-------------------------|--|
| <b>ELISA</b>            |  |
| ELISA Reader            | OpsysMR, DYNEX Technologies                                  |
| Software                | DYNEX Revelation™ QuickLink                                  |
| <b>Frets Messung</b>    |  |
| Fluorimeter             | Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems                      |
| Software                | Ascent Software, Fluoroskan                                  |
| <b>Multimeranalyse</b>  |  |
| Elektrophoresekammer    | LKD Bromma 2117 Multiphor, Pharmacia Biotech                 |
| Elektrophoreseapparatur | Electrophoresis Power Supply - EPS 601, Amersham Biosciences |
| Blotkammer              | Trans-Blot® Cell, 49BR, BIO RAD                              |
| Blotgerät               | Power Pac™ HC, BIO RAD                                       |

## Mäuse und Materialien

| Name                                 | Firma   |
|--------------------------------------|---|
| <b>Blutanalyse</b>                   |   |
| Automatischer Hämatologie-Analysator | Sysmex KX-21N HEMAVET 950FS   |
| <b>PCR</b>                           |   |
| Spektrophotometer                    | NANODROP 2000c, Thermo Scientific   |
| Thermocycler                         | Mastercycler® pro S, vapo.protect, Eppendorf C1000™, CFX96™ Real-Time System, BIO RAD   |
| <b>Sonstige Geräte</b>               |   |
| Pipetten                             | Eppendorf Reference® Pipetten 0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl<br>Eppendorf Research® plus, (multichannel), 30-300µl Multipette® plus, Eppendorf |
| Pipettenspitzen                      | epT.I.P.S.® 10µl, 200µl, 1000µl, Eppendorf  |
| Feinwaage                            | CPA 1003P, Sartorius  |
| Magnetrührer                         | neoMag-Standard-Magnetrührer, D-6011, neoLab®   |
| Zentrifuge                           | Allegra X-30R Series, BECKMAN COULTER<br>Rotor F2402H   |
| Tischzentrifuge                      | REMI Elektrotechnik Limited   |
| pH-Meter                             | HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments   |
| Mikrowelle                           | MD 12801, studio  |
| Kreisschüttler                       | lab dancer, VWR   |
| Rüttelplatte                         | ORBITAL SHAKER DOS-10L, neoLab®   |
| Wasserbad                            | Julabo ED-5A  |
| Kühlung                              | Umwälzthermostat, Model 1162A, VWR  |

### 3 METHODEN

#### 3.1 DNS GEWINNUNG UND PCR-GENOTYPISIERUNG

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer kurzer DNS Abschnitte. Sie wurde 1993 von Kary Mullis entwickelt und zwei Jahre später von Saiki veröffentlicht [133]. Seitdem ist sie eine wichtige Methode der Molekularbiologie, die unter anderem dazu eingesetzt wird, Erbkrankheiten und Viruserkrankungen nachzuweisen, genetische Fingerabdrücke zu erstellen sowie Gene zu klonieren.

Die vervielfältigten DNS Abschnitte können im Anschluss an die PCR mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung verschieden großer Fragmente in einem elektrischen Feld. Große negativ geladene Moleküle wandern hierbei langsamer als kleine negativ geladene Moleküle vom Minus- zum Pluspol.

Eine Genotypisierung mittels PCR zum Ausschluss von Zuchtfehlern erfolgte stichprobenartig bei jedem 5. Wurf, da es sich bei den Adamts13-defizienten Mäusen um homozygote Knockout Mäuse handelte und auch nur diese untereinander weiter verpaart wurden.

Hierfür wurden ca. 3 mm lange Schwanzspitzen der Mäuse verwendet. Aus diesen wurde mit 40 µl Lysispuffer unter 20-minütiger Hydrolyse bei 95 °C und anschließender Neutralisation mit 40 µl Neutralisationspuffer genomische DNS freigesetzt. Davon wurden 3 µl für die genotypisierungs PCR eingesetzt.

Das Protokoll der genotypisierungs PCR wurde vom „National Institute of Biomedical Innovation“, Osaka, Japan zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung wurde mit den folgenden 3 Primern für die Adamts13 Allele durchgeführt:

Adamts 5'F 5'-ACC CTA TCT CTG GCC TGT ATT CCT-'3

Adamts 5'R1 5'-TAC TGA CTT GTG ACC ACA AGC CCT-'3

Adamts 5'R2 5'-ATC GAG TCT AGC TTG GCT GGA CGT-'3

Das Primerpaar Adamts 5'F und Adamts 5'R1 bildet ein Produkt mit einer Größe von 616 Bp, das von Wildtyp Allelen stammt. Das Primerpaar Adamts 5'F und Adamts 5'R2 führt zu einem Produkt mit 350 Bp, das von Knockout Allelen stammt.

Die Primer wurden auf eine Konzentration von 10µM verdünnt, wovon dann jeweils 1 µl für die PCR Reaktionsmischung eingesetzt wurde (Endkonzentration 0,5 µM).



## Methoden

Die Reaktionsmischung enthielt außerdem 10 µl HotStarTaq *Plus* Master Mix (Qiagen) und 4 µl Wasser.

Die PCR erfolgte unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 12: PCR Protokoll der Genotypisierung von Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen

| Schritt                | Dauer  | Temperatur | Wiederholung |
|------------------------|--------|------------|--------------|
| Initiale Denaturierung | 15 min | 95 °C      | 1x           |
| Denaturierung          | 20 sec | 94 °C      | 35x          |
| Hybridisierung         | 20 sec | 57 °C      |              |
| Elongation             | 40 sec | 72 °C      |              |
| Finale Elongation      | 5 min  | 72 °C      | 1x           |
| Abkühlung              | ∞      | 4 °C       | 1x           |

Nach der PCR wurden je 10 µl der Reaktionsmischungen zusammen mit einem 5 kb Standard auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen, die Produkte bei einer konstanten Spannung von 80 V aufgetrennt und anschließend mit Hilfe von GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 3.2 qRT-PCR

Die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit der zusätzlichen Möglichkeit ihrer zeitgleichen Quantifizierung. Dies wird durch interkalierende DNS-Farbstoffe (z.B. SYBR Green) erreicht, deren Farbintensität in Korrelation zur Menge der vervielfältigten DNS steht. Für die relative Quantifizierung wird zusätzlich zum untersuchten Gen eine interne Kontrolle, auch „House-Keeping“ Gen genannt, mit gemessen. Dies sollte ein Gen sein, dessen Expression in der zu untersuchenden Probe möglichst konstant ist. In dieser Arbeit wurde hierfür L32 gewählt. Dieses Gen kodiert für ein β-Protein, das mit der großen Untereinheit des Ribosoms assoziiert ist. Die Expression der untersuchten Gene wird zunächst als Ct-Wert (engl. **C**ycle **t**hreshold für Schwellenwert-Zyklus) angegeben. Dieser gibt den Anfang des Wachstums einer exponentiellen Wachstumskurve an. Die

## Methoden

Amplifikation spezifischer DNS-Fragmente während der PCR wird in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Menge an DNS noch so gering, dass die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von DNS-Fragment, Primer und Polymerase äußerst gering ist. Somit findet in dieser Phase nur eine sehr geringe Vervielfältigung der DNS-Fragmente statt. Ist ein bestimmter Schwellenwert an DNS-Fragmenten erreicht (Ct-Wert), so kommt es in der zweiten Phase der Amplifikation zu einem exponentiellen Anstieg der DNS-Fragmente und somit auch zu einem exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Diese Phase ist sehr kurz, da eine zu große Menge an DNS-Fragmenten letztendlich zu einem Verbrauch der Substrate führt und diese durch die Hitze auch langsam zerstört werden. Nur in der exponentiellen Phase der PCR herrschen somit optimale Reaktionsbedingungen, sodass eine Quantifizierung auch nur in dieser Phase möglich wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde, auf Grund des zu erwartenden vollständigen Fehlens von Adamts13 bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen, diese Methode lediglich zum qualitativen Nachweis spezifischer Adamts13-RNS verwendet, sodass keine Berechnung unterschiedlicher RNS-Expressionen durchgeführt wurde.

Die Leber wurde bisher als Hauptexpressionsort für Adamts13 beschrieben [20], es konnte aber auch schon Adamts13 in Thrombozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden [22, 23], sodass hierfür RNS aus Leber und Knochenmark von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und in cDNS umgeschrieben wurde. Anschließend wurde die qRT-PCR mit den Primern mouAdamts13\_for und mouAdamts13\_rev durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass gleichviel cDNS von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mausgewebe verwendet wurde, wurde gleichzeitig eine qRT-PCR für L32 mit den L32\_for und L32\_rev Primern durchgeführt.

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann die spezifische Replikation des gewünschten cDNS Fragments überprüft werden. Da die zu untersuchenden cDNS Abschnitte für L32 und für Adamts13 eine unterschiedliche Anzahl an Basenpaaren haben, erfolgt eine Denaturierung der Doppelstränge zu einzelsträngigen Molekülen bei unterschiedlich hohen Temperaturen. Je höher die Anzahl der Basenpaare ist, desto höher liegt auch die Schmelztemperatur. Sobald die Fragmente denaturieren, wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green freigesetzt, was mit einer Emission von Fluoreszenzlicht bei 521 nm gemessen werden kann und sich im Schaubild als Peak darstellt. Die Höhe des Peaks gibt einen quantitativen Anhaltspunkt über die Menge des gebildeten DNS-Fragments. Wurde kein spezifisches cDNS-Fragment gebildet, so fehlt der Peak komplett.

## Methoden

Die qRT-PCRs wurden in Dreifachbestimmung mit dem Kit iQ™ SYBR® Green Supermix nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 4 µl cDNS (Endkonzentration 1 ng/µl) eingesetzt. Folgendes, in Tabelle 13 aufgeführte PCR Programm, wurde angewendet:

Tabelle 13: qRT-PCR Programm

| Schritt                       | Dauer  | Temperatur | Wiederholung                                 |
|-------------------------------|--------|------------|--|
| <b>Initiale Denaturierung</b> | 3 min  | 95 °C      | 1  |
| <b>Amplifikation</b>          | 2 sec  | 98 °C      | 60x  |
|                               | 5 sec  | 60 °C      |  |
| <b>Schmelzkurve</b>           | 10 sec | 75 °C      | 75 °C zu 95 °C mit 0,2 °C Zunahme für 10 sec |
|                               | 2 sec  | 95 °C      |  |

### 3.3 ADAMTS13 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Die Adamts13 Aktivität im Blutplasma der Mäuse wurde mit einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRETs) Assay gemessen (auch Förster Resonanz Energie Transfer genannt).

Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der eine abstandsabhängige Energieübertragung eines Donorionophors/Donorfarbstoffs auf einen Akzeptorfarbstoff stattfindet. Wird dieser Abstand verändert, kann die strahlungsfreie Dipol-Dipol Wechselwirkung nicht mehr stattfinden und der Donorfarbstoff gibt seine Energie in Form eines Photons ab, was durch einen Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden kann.

Da es für die Messung der Adamts13 Aktivität in Mausplasma kein kommerziell erhältliches Kit gibt, musste zunächst ein Adamts13 Aktivitätsassay für Mausplasma etabliert werden. Die Adamts13 Aktivität im Blut der Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wurde mittels des FRETs-VWF73 Substrates (FRETs-VWF73 „fluorogenic substrate assay“, Peptide Institute Inc., Japan) aus Citrat-Plasma gemessen.

## Methoden

Hierbei handelt es sich um einen rekombinant hergestellten Abschnitt des VWFs, mit einer Länge von 73 Aminosäuren, an den sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptorfarbstoff gekoppelt wurde. Die proteolytische Spaltung des FRETs-VWF73 zwischen den beiden Farbstoffen durch Adamts13 führte zu einer Entkopplung von Donor- und Akzeptorfarbstoff und somit zu einem Anstieg der Fluoreszenz, der mit einem Spektrofluorometer detektiert wurde.

Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde das Substrat nach Anleitung in DMSO und destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gelöst und anschließend 25-fach mit Reaktionspuffer verdünnt (Endkonzentration 4  $\mu\text{M}$ ).

Die Plasmaproben wurden bei 37 °C für 10 min im Wasserbad aufgetaut. Als Standard diente der Standard des ACTIFLUOR™ ADAMTS13 activity kits (American Diagnostica GmbH) mit bekannter ADAMTS13 Aktivität (760 ng/ml), der ebenfalls bei 37 °C für 10 min im Wasserbad aufgetaut wurde. Dieser wurde mit Reaktionspuffer 40-fach verdünnt eingesetzt (entspricht 19 ng/ml) und über 4 Wells 1:2 weiter titriert, um eine Standardgerade mit linearer Regression erstellen zu können.

Die Mausplasmaproben wurden mit Reaktionspuffer auf ein Verhältnis von 1:20 verdünnt und anschließend im Assay eingesetzt. Die Fluoreszenz, die bei Spaltung des FRETs-VWF73 durch Adamts13 bei 37 °C entsteht, wurde in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Fluoroskan® Ascent, Thermo Scientific) mit einer Extinktion von 340 nm und einer Emission von 450 nm über 120 min im Abstand von 10 min gemessen.

Aus den Steigungen der Standardgeraden wurde eine lineare Regressionsgerade erstellt und darüber die Aktivität der einzelnen Plasmaproben berechnet.

### 3.4 VON WILLEBRAND FAKTOR MULTIMERANALYSE

Die VWF Multimeranalyse dient der Darstellung qualitativer Veränderungen des VWFs und erfolgt aus Citrat-Plasma durch Auftrennung der VWF-Multimere in einem 1%-SDS-Agarosegel mit horizontaler Elektrophorese und anschließend immunologischem Nachweis der VWF-Multimere mittels Western-Blot Verfahren. VWF wird in Form von ultralangen Multimeren aus den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen sowie aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten nach Stimulation freigesetzt und daraufhin direkt im Blut durch ADAMTS13 in kleinere Multimere gespalten. Ein Fehlen dieser Protease führt zu einer Persistenz der ultralangen

## Methoden

Multimere, was in der VWF Multimeranalyse darstellbar ist und die typische Konformationsänderung des VWFs bei TTP Patienten darstellt.

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, das meist zur Auftrennung von DNS Fragmenten anhand ihrer Größe verwendet wird. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung verschieden großer Fragmente in einem elektrischen Feld. Große negativ geladene Moleküle wandern hierbei langsamer als kleine negativ geladene Moleküle vom Minus- zum Pluspol.

Da der VWF mit einer Größe von bis zu 20000 kDa eines der größten Proteine darstellt, ist eine Auftrennung der einzelnen Multimere mit der, für kleinere Proteine üblichen, SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nicht gut möglich. Die Darstellung der individuellen Oligomere des VWFs mit Hilfe der SDS-Agarosegelelektrophorese wurde erstmals durch Ruggeri und Zimmermann [134] sowie durch Hoyer und Shainoff [135] beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Budde [136] verwendet. Hierfür wurde das Citrat-Plasma bei 37 °C für 10 min im Wasserbad aufgetaut und anschließend mit 1- und 2-fach Probenpuffer insgesamt 1:10 verdünnt. Dafür wurden zunächst 20 µl Citrat-Plasma mit 20 µl 2-fach Probenpuffer verdünnt und hierzu dann 150 µl 1-fach Probenpuffer und 10 µl Bromphenolblaulösung zugefügt. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation der Proben über 30 min bei 58 °C im Wasserbad. Bevor die Proben auf das Gel geladen wurden, wurden sie für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (6000 RPM) in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend 45 µl je Probe auf das Gel aufgetragen.

Als Kontrolle für ein physiologisches VWF Multimermuster ohne ultralange Multimere wurde humanes Poolplasma von verschiedenen gesunden Spendern verwendet. Plasma, das als überschüssiges Restmaterial von TTP-Patienten während eines Schubes stammte, diente als Positivkontrolle für UL VWF Multimere.

Die Elektrophorese wurde bei 13 mA gestartet. Nach ca. 1,5 h, wenn die Proben vollständig aus den Ladetaschen in das Gel diffundiert waren, wurden die Ladetaschen mit Sammelgel verschlossen und die Stromstärke auf 15 mA erhöht. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung (8 °C) über ca. 23 h. Hierbei erreichte die blaue Bromphenol-Front das Ende des Gels. Nach Abstoppen der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in Elektrophoresepuffer inkubiert, um einen eventuellen Hintergrund auf der Folie zu minimieren.

Der Western-Blot erfolgte mit einem Nass-Tank Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran. Dies wurde über 3 h unter Kühlung (4 °C) bei 1A durchgeführt.

## Methoden

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, 5 min in Waschpuffer inkubiert und 1 h mit Blockpuffer geblockt. Der polyklonale Kaninchen Anti-Human VWF Antikörper (DakoCytomation A 0082) wurde als Primärantikörper verwendet und in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer über je 10 min bei Raumtemperatur wurde die Membran mit einem Alkalische Phosphatase gekoppelten Detektionsantikörper (polyklonale Ziege Anti-Kaninchen Immunglobuline-AP, DakoCytomation D 0487) in einer Verdünnung von 1:1000 in Waschpuffer für 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten für je 10 min wurde die Membran schließlich mit 40 ml BCIP/NBT Lösung bei Raumtemperatur angefärbt.

### 3.5 VON WILLEBRAND FAKTOR ELISA

Der ELISA („Enzym-linked Immunosorbent Assay“) ist ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis kleinster Mengen eines Proteins. Das Protein/Antigen wird hierbei durch die Bindung an einen spezifischen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und anschließend wird mit Hilfe eines Enzym-markierten Zweitantikörpers und dem entsprechenden Substrat eine Farbreaktion ausgelöst. Die Stärke der Farbreaktion wird photometrisch gemessen und ist proportional zur Konzentration des Antigens.

Der VWF:AG Gehalt kann mit Hilfe eines ELISA sowohl in Citrat-Plasma als auch in EDTA-Plasma gemessen werden. Da EDTA-Plasma auch aus kleinsten Mengen EDTA-antikoagulierte Vollblut hergestellt werden kann und hierbei keine Verdünnung des Plasmas durch EDTA erfolgt, wurde diese Methode bevorzugt verwendet. Hierfür wurden ca. 50 µl Blut unter kurzzeitiger Isoflurannarkose retroorbital mittels Hämatokritkapillare entnommen und zu Plasma weiterverarbeitet.

Bei dem für diese Arbeit etablierten VWF ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Hierfür wurde eine Nunc Maxisorp 96-well Platte, mit 50 µl/well polyklonalem anti-VWF Antikörper (Dako A 0082) 1:1000 verdünnt in Coating-Puffer, über Nacht bei 4 °C beschichtet. Danach wurde die Platte für 1 h mit 200 µl/well Blockpuffer geblockt. Die zu analysierenden EDTA-Plasma oder Citrat-Plasmaproben wurden zunächst bei 37 °C im Wasserbad für 10 min aufgetaut und im Anschluss an das Blocken wurden 100 µl/well der Plasmaproben in einer Verdünnung von 1:200 in Blockpuffer in Duplikaten aufgetragen und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Standard diente eine humane EDTA-Plasma bzw. Citrat-Plasmaprobe mit bekanntem VWF:AG Gehalt. Diese wurde so verdünnt, dass eine Standardgerade zwischen 0 und 10 mU/ml VWF:AG erstellt werden konnte. Als Detektionsantikörper wurde ein HRP („horse

## Methoden

radish peroxidase“) gekoppelter polyklonaler anti-VWF Antikörper (Dako P 0226) verwendet. Hiervon wurden 100 µl/well in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen jedem Arbeitsschritt wurde die Platte dreimal mit 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Als Substrat für die Meerrettich Peroxidase wurden 80 µl/well Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung pipettiert. Diese erfährt durch Substrathydrolyse innerhalb weniger Minuten eine deutliche Blaufärbung. Um die Reaktion zu stoppen, wurden weitere 80 µl/well 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzu pipettiert, was zu einem gelben Farbumschlag führte. Die Farbreaktion wurde photometrisch bei einer Absorptions-Wellenlänge von 450 nm im ELISA Reader gemessen und mit der Software DYNEX Revelation<sup>TM</sup> QuickLink analysiert.

### 3.6 BLUTENTNAHME

Für die Blutentnahme bei den Mäusen wurden unterschiedliche Techniken angewandt. Für eine kleine Menge Blut (~ 50 µl) mit Überleben der Tiere, wurde den Mäusen unter kurzzeitiger Isoflurannarkose mittels 1,5 cm langen Hämatokritkapillaren retroorbital Blut entnommen.

Wurden größere Mengen Blut (>500 µl) benötigt, erfolgte ein Ausbluten der Tiere unter tiefer Ketamin/Xylazin Narkose (10 µl/g Körpergewicht i.p. einer Lösung aus 10 mg/ml Ketamin und 0,8 mg/ml Xylazin) entweder retroorbital, über die Vena cava oder durch Herzpunktion.

Für die Gewinnung von EDTA-Vollblut wurden Microvette® CB 300 K2E Röhrchen von Sarstedt verwendet. EDTA-Plasma wurde über zwei Zentrifugationsschritte gewonnen. Die erste Zentrifugation wurde bei 800 x g über 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals bei 12900 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das EDTA-Plasma wurde dann aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Bei einer Blutentnahme von insgesamt ca. 1 ml Citrat-Vollblut wurden in einer 2 ml Spritze 100 µl einer 0,106 M Citrat-Lösung (aus S-Monovetten® von Sarstedt) vorgelegt und mit dieser eine Herzpunktion durchgeführt. Die Zentrifugation zur Gewinnung von Citrat-Plasma erfolgte, wie bei EDTA-Plasma bereits beschrieben, in zwei Zentrifugationsschritten. Das Citrat-Plasma wurde auch bei -80 °C gelagert.

### 3.7 BLUTBILD

Die Blutbilder wurden aus EDTA Vollblut mit dem automatischen Hämatologie-Analysator Sysmex KX-21N, Programmversion 00-10 erstellt.

### **3.8 BLUT AUSSTRICHE**

Der Blutaussstrich ist eine Methode zur mikroskopischen Analyse der Blutzellen, die insbesondere in der Hämatologie und Onkologie eine wichtige Rolle spielt. Hierbei können Form und Struktur der einzelnen Blutzellen sowie parasitäre Erkrankungen des Blutes erkannt und beurteilt werden. Für die Diagnose der TTP ist ein Blutaussstrich insbesondere wichtig, um das Vorhandensein von Fragmentozyten der Erythrozyten beurteilen zu können.

Die Blutaussstriche wurden nach standardisierten Protokollen angefertigt. Hierfür wurde ein Tropfen (2 µl) EDTA-Vollblut auf einen Objektträger gegeben und mit der Kante eines zweiten schräggehaltenen Objektträgers (ca. 45°) ausgestrichen. Anschließend wurden die Blutaussstriche getrocknet und eine Pappenheimfärbung durchgeführt.

Die panoptische Färbung nach Pappenheim enthält basische Farbstoffe (Methylenblau, Brillantkresylblau), die Zellbestandteile mit negativer Ladung (Zellkerne) blau anfärben sowie saure Farbstoffe (Eosin, Säurefuchsin), die Zellbestandteile mit positiver Ladung (Zytoplasma) rot anfärben.

Für die Färbung der Blutaussstriche wurden diese 4 min in unverdünnter May Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung inkubiert, zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und dann weitere 20 min in 10-fach verdünnter Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit destilliertem Wasser wurden die Blutaussstriche getrocknet und lichtmikroskopisch bei einer 1000-fachen (10 x 100) Vergrößerung mit Immersionsöl analysiert.

### **3.9 ORGANENTNAHME BEI MÄUSEN**

Die Organentnahme bei Mäusen erfolgte nach Tötung durch zervikale Dislokation unter tiefer Isoflurannarkose. Die Organe wurden je nach Fragestellung für weitere molekularbiologische Untersuchungen direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder aber für weitere histologische Untersuchungen in 4% (w/v) phosphatgepufferter Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4%, Carl Roth) fixiert.

### **3.10 ISOLIERUNG VON RNS AUS MAUSGEWEBE**

Die Isolierung von RNS aus Mausgewebe (Leber, Knochenmark) erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe der Qiagen Kits RNeasy Mini Kit und RNase-Free DNase Set.

Die Konzentration der isolierten RNS wurde mit dem Spektrophotometer NANODROP 2000c gemessen und die RNS bei -80 °C gelagert.



### 3.11 cDNS SYNTHESE AUS RNS

Die cDNS aus RNS wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcript“ Kit von Life Technologies synthetisiert. Es wurden 0,5 bzw. 1 µg RNS für die cDNS-Synthese eingesetzt mit einer Endkonzentration von 25 bzw. 50 ng/µl cDNS. Für die Lagerung der cDNS bei -20 °C wurde diese mit Wasser weiter auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt. Davon wurden 4 µl für die qRT-PCR eingesetzt (1 ng/µl Endkonzentration im PCR-Ansatz).

### 3.12 *IN-VIVO* THROMBOSE MODELL

Zur Überprüfung des prothrombotischen Zustands der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wurde sowohl Wildtyp als auch Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen eine Mischung aus 600 ng/g KGW Kollagen und 60 ng/g KGW Epinephrin intravenös in die Schwanzvenen injiziert. 15 Minuten nach Injektion wurde retroorbital Blut entnommen und aus dem hierbei gewonnen EDTA-antikoagulierten Vollblut die Thrombozytenzahlen bestimmt. Um den prozentualen Verbrauch an Thrombozyten zu berechnen, wurde bereits zwei Tage vor Versuchsdurchführung Blut entnommen und die Thrombozytenzahlen der unbehandelten Mäuse bestimmt.

### 3.13 PROTOKOLLE ZU UNTERSUCHUNGEN VON TTP-TRIGGERFAKTOREN

#### 3.13.1 UNTERSUCHUNG VON VWF ALS TRIGGERFAKTOR FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN

##### 3.13.1.1 REKOMBINANTER VWF

Nachdem Schiviz et al. 2012 [123] veröffentlichten, dass die Injektion einer sehr hohen Konzentration von rhVWF (2000 VWF:RCoU/kg KGW) TTP-typische Symptome in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auslöst, sollte dieses Modell in unseren Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse überprüft werden. Der rhVWF wurde freundlicherweise von der Firma Baxter zur Verfügung gestellt.

Zwei Tage vor Behandlung mit rhVWF wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen. Aus dem hierbei gewonnen EDTA-Vollblut wurde zunächst die Thrombozytenzahl der Mäuse in unbehandeltem Zustand bestimmt und anschließend EDTA-Plasma hergestellt, um die VWF:AG Konzentration der unbehandelten Mäuse zu bestimmen.

Zu Versuchsbeginn erhielten die Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse 2000 VWF:RCoU/kg KGW als Bolusinjektion in die laterale Schwanzvene. Die Mäuse wurden dann über eine Versuchsdauer von insgesamt 8 h alle 2 h auf Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Haltung und des Verhaltens beobachtet. Nach 8 h wurden die Mäuse unter tiefer Ketamin/Xylazin Injektionsnarkose retroorbital entblutet und sowohl

## Methoden

EDTA- als auch Citrat-Vollblut gewonnen. Das EDTA-Vollblut wurde direkt nach Blutentnahme mittels Sysmex KX21N analysiert und ein Blutaussstrich angefertigt. Anschließend aufgearbeitetes EDTA-Plasma wurde zur Bestimmung der VWF:AG Konzentration verwendet.

### **3.13.1.2 HUMANES VWF-KONZENTRAT**

Humanes VWF-Konzentrat (Wilfactin®) wurde freundlicherweise von der Firma LFB-BIOMEDICAMENTS zur Verfügung gestellt. Um ein ausreichend hochkonzentriertes VWF-Konzentrat zu erhalten (500 VWF:RCoU./ml), wurde Wilfactin® (1000 VWF:RCoU) entgegen der Herstellerangaben von 10 ml in 2 ml Aqua ad iniectionem gelöst.

Zwei Tage vor Behandlung mit VWF-Konzentrat wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen. Aus dem hierbei gewonnenen EDTA-Vollblut wurden zunächst die Thrombozytenzahlen in unbehandeltem Zustand bestimmt und anschließend EDTA-Plasma hergestellt, um die VWF:AG Konzentration der unbehandelten Mäuse zu messen.

Zu Versuchsbeginn erhielten die Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse 2000 VWF:RCoU/kg KGW als Bolusinjektion in die laterale Schwanzvene. Die Mäuse wurden dann über eine Versuchsdauer von insgesamt 8 h alle 2 h auf Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Haltung und des Verhaltens beobachtet. Nach 8 h wurden die Mäuse unter tiefer Ketamin/Xylazin Injektionsnarkose retroorbital entblutet und sowohl EDTA- als auch Citrat-antikoaguliertes Vollblut gewonnen.

### **3.13.1.3 UNTERSUCHUNG VON ENDOGENEM VWF ALS TRIGGERFAKTOR FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN MITTELS HISTAMIN-INJEKTION**

Histamin ist ein biogenes Amin, das im Körper insbesondere in Mastzellen, basophilen Granulozyten und im Nervengewebe vorkommt und eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen spielt. Es wirkt sowohl als Gewebshormon als auch als Neurotransmitter und bewirkt im Blut unter anderem die Ausschüttung von VWF aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen als auch aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten [60, 137]. Die Stimulation der Ausschüttung endogenen VWFs aus Endothelzellen und Thrombozyten erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 200 bzw. 400  $\mu$ l einer 0,1 M Histaminlösung.

Zwei Tage vor Histamin-Stimulation wurde den Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen retroorbital EDTA-Blut entnommen. Hieraus wurden zunächst Thrombozytenzahlen der Mäuse in unbehandeltem Zustand bestimmt und anschließend EDTA-Plasma hergestellt, um die VWF:AG Konzentration der unbehandelten Mäuse zu messen.

Zwei Stunden nach Histamin Stimulation wurde den Mäusen wiederum retroorbital Blut entnommen, um Thrombozytenzahlen und VWF:AG Konzentrationen nach Histamin Behandlung zu bestimmen.

### **3.13.2 UNTERSUCHUNG VON HISTONEN ALS TRIGGERFAKTOREN FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

In einem Paper von Fuchs et al. 2012 [138] werden Histone als mögliche zusätzliche Triggerfaktoren („second hit“) für TTP beschrieben. Die „second hit“ Hypothese besagt, dass ein Mangel bzw. Fehlen von ADAMTS13 zwar eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung einer TTP darstellt, nicht jedoch die alleinige Ursache für die TTP ist, sondern ein zusätzlicher Triggerfaktor benötigt wird.

Histone sind basische Proteine, die im Zellkern für die Verpackung/Organisation der DNS zuständig sind. Extrazellulär agieren Histone im Bereich der angeborenen Immunabwehr. Im Verlauf einer Sepsis steigt die Konzentration an Histonen im Blut stark an und dient unter anderem als Anhaltspunkt für die Schwere einer Sepsiserkrankung. Histone wirken prothrombotisch, da sie Thrombozyten aktivieren und somit eine Thrombose auslösen können. Daher sollte untersucht werden, ob Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse empfindlicher auf eine Stimulation mit Histonen reagieren als 129/Sv Wildtyp-Mäuse.

Hierfür wurde den Mäusen zwei Tage vor Behandlung mit Histonen retroorbital Blut entnommen, um die Thrombozytenzahlen der unbehandelten Mäuse zu ermitteln.

Die Mäuse wurden dann mit 50 mg/kg KGW, 25 mg/kg KGW und 12,5 mg/kg KGW Histone (Histonmischung aus Kälber-Thymus) gelöst in PBS mittels intravenöser Schwanzveneninjektion behandelt. Nach einer Versuchsdauer von 15 min wurde den Mäusen wiederum retroorbital Blut entnommen und die Thrombozytenzahlen in EDTA-antikoagulierte Vollblut bestimmt, um den prozentualen Verbrauch der Thrombozyten in Abhängigkeit vom Ausgangswert zu berechnen.

### **3.13.3 UNTERSUCHUNG VON CHININ ALS TRIGGERFAKTOR FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Chinin ist ein bekannter Triggerfaktor für die TTP beim Menschen. Es ist sowohl in Lebensmitteln, z.B. Schweppes® als auch Medikamenten, z.B. Limptar® enthalten. Es sind Fälle beim Menschen beschrieben, bei denen nach einmaliger Einnahme von Chinin innerhalb weniger Stunden ein akuter TTP Schub eintrat [139, 140]. Teilweise hatten die Patienten Chinin einige Jahre zuvor schon einmal eingenommen [141]. Bei anderen Patienten entstand die TTP nach längerer regelmäßiger Einnahme kleiner Mengen Chinin, meist zur Behandlung nächtlicher Wadenkrämpfe [102, 142].

Daher wurde Chinin als möglicher Triggerfaktor für die TTP in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen in zwei unterschiedlichen Versuchsmodellen getestet: 1. Modell der hochdosierten Chinin-Bolus Behandlung und 2. Modell der niedrigdosierten kontinuierlichen Chininbehandlung.

### **3.13.3.1 MODELL DER HOCHDOSIERTEN CHININ-BOLUS BEHANDLUNG**

Da der Referenzbereich der Thrombozytenzahl für Mäuse sehr hoch ist (864 – 1362 x 10<sup>3</sup>/µl für 129S2/SvPas [143, 144]), wurde allen Mäusen zwei Tage vor Behandlung mit Chinin Blut entnommen und die darauffolgenden Messungen jeweils auf den Ausgangswert bezogen. Zu Versuchsbeginn (Tag 1) wurden Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse oral per Schlundsonde mit 3 mg Chinin behandelt (55 mg/ml Chinin in 33,33% Ethanollösung). Als Kontrolle wurden sowohl Wildtyp als auch Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit derselben Menge (200µl) 33% - Ethanollösung oral per Schlundsonde behandelt. Anschließend wurden die Tiere die ersten zwei Tage nach Behandlung alle 4 h auf Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Haltung und des Verhaltens beobachtet. Nach 6 h, 24 h und 48 h wurde im Wechsel je 3 Tieren pro Versuchsgruppe Blut entnommen, um Veränderungen der Thrombozytenzahlen zu beobachten. Weitere Blutentnahmen erfolgten an den Tagen 7, 9 und 11 nach Chininbehandlung. Da die Tiere innerhalb der ersten 13 Tage keinerlei Reaktion auf die Chininbehandlung zeigten, wurde eine weitere orale Chininbehandlung mit 2 mg Chinin an Tag 14 durchgeführt. Die Tiere wurden wiederum innerhalb der ersten 2 Tage nach erneuter Chininbehandlung alle 4 h auf Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Haltung und des Verhaltens beobachtet. Weitere Blutentnahmen erfolgten 6 h nach Behandlung (Tag 14), an Tag 16 und Tag 18. An Tag 21 wurde der Versuch beendet. Die Tiere wurden unter tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose entblutet, um EDTA- sowie Citrat-Blut für weitere Analysen zu gewinnen.

### **3.13.3.2 MODELL DER NIEDRIGDOSIERTEN, KONTINUIERLICHEN CHININBEHANDLUNG**

Wiederum wurde den Mäusen zwei Tage vor Behandlung mit Chinin retroorbital Blut entnommen, um die Thrombozytenzahlen der unbehandelten Mäuse zu ermitteln.

Die kontinuierliche Chininzufuhr erfolgte über das Trinkwasser. Hierzu wurden 30 µg/ml Chinin im Trinkwasser gelöst und den Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen über einen Zeitraum von 21 Tagen verabreicht. Die Mäuse wurden regelmäßig auf Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Haltung und des Verhaltens beobachtet. Die erste Blutabnahme nach Versuchsbeginn erfolgte an Tag 14. Eine weitere Blutabnahme wurde an Tag 21 durchgeführt und anschließend die Chiningabe beendet. Da keine Veränderungen durch die Chininbehandlung zu erkennen waren, wurde nach einem Beobachtungszeitraum von weiteren 14 Tagen nochmals eine hochdosierte

Chininbehandlung mit 2 mg Chinin oral durchgeführt und der Versuch 24 h nach dieser Behandlung beendet. Die Tiere wurden unter tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose entblutet, um EDTA-Blut sowie Citrat-Blut für weitere Analysen zu gewinnen.

### **3.13.4 ENTZÜNDUNGSMODELL DER LPS-INDUZIERTEN AKUTEN LUNGENSCHÄDIGUNG**

Die Blutentnahme und Blutanalyse vor und bei Durchführung des Entzündungsmodells ist Teil dieser Arbeit, wobei die Durchführung des Entzündungsmodells selbst nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Dies wurde von Herrn Dr. Bosmann im Centrum für Thrombose und Hämostase in Mainz durchgeführt.

Um die Thrombozytenzahlen der Mäuse in unbehandeltem Zustand zu bestimmen, wurde den Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen zwei Tage vor Durchführung des Entzündungsmodells retroorbital EDTA-Blut entnommen.

Zur Auslösung der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung wurde bei Ketamin und Xylazin anästhesierten Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen 40 µg LPS (von *E. coli*, O111:B4) durch intratracheale Injektion appliziert.

Nach einer Versuchsdauer von 8 h wurden die Mäuse unter tiefer Isofluran Inhalationsnarkose entblutet und anschließend eine Bronchoalveolarlavage durchgeführt. Das Vollblut wurde mit Hilfe des automatischen Hämatologiesystems Sysmex KX21N analysiert. Anschließend wurde Plasma gewonnen, das für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren wurde. Die gewonnene Bronchoalveolar-Flüssigkeit wurde von Herrn Dr. Bosmann mittels Neubauer Zählkammer direkt auf das Vorhandensein von Leukozyten untersucht und für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren.

### **3.13.5 DAS ASPERGILLUS FUMIGATUS PNEUMONIEMODELL**

Die Blutentnahme und Blutanalyse mit Hilfe des automatischen Hämatologiesystems KX21N vor und bei Durchführung des Entzündungsmodells ist Teil dieser Arbeit, wobei die Durchführung des Pneumoniemodells selbst nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Das Modell wurde von Herrn Steve Prüfer im Institut für Immunologie in Mainz durchgeführt [145].

Um die Thrombozytenzahlen der Mäuse in unbehandeltem Zustand zu bestimmen, wurde den Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen zwei Tage vor Durchführung des Pneumoniemodells retroorbital EDTA-Blut entnommen.

Zur Auslösung der Pneumonie wurden die mit Ketamin und Xylazin anästhesierten Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse durch intratracheale Eingabe von 10<sup>7</sup> Konidien in 100µl PBS-Lösung mit *Aspergillus fumigatus* infiziert. Anschließend wurden sie für 2 min

## Methoden

beatmet, um die Verteilung der Pilzkonidien zu verbessern. Nach einer Versuchsdauer von 24 h wurden einige Mäuse entblutet und eine Bronchoalveolarlavage durchgeführt.

Anschließend wurde die Lunge herauspräpariert und nach Fixierung in 4% PFA von der Core Facility Histologie in Paraffin eingebettet und Lungenschnitte (2-3 µm dick) erstellt. Diese wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) angefärbt, um die Entzündungsreaktion zu analysieren. Zur Beurteilung der Abtötung der Pilze *in-vivo* wurde die Lunge bei einigen Mäusen präparativ entfernt und in 1 ml kaltes PBS aufgenommen. Es wurden Lungenhomogenate hergestellt, die in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:5000 auf Sabouraud-4%-Dextroseagarplatten ausgestrichen wurden. Nach 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die erhaltenen CFU (engl. colony-forming units) ausgezählt.

Das Vollblut wurde mit Hilfe des automatischen Hämatologiesystems KX21N analysiert, anschließend Plasma gewonnen und für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren. Eine Teilmenge des Vollbluts wurde von Herrn Prüfer mittels FACS-Analyse auf polymorphonukleäre Leukozyten untersucht. Die gewonnene Bronchoalveolar-Flüssigkeit wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse auf polymorphonukleäre Zellen untersucht und der Rest für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren.

### 3.14 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die Auswertung und Darstellung der Messwerte wurde das Programm GraphPad PRISM Version 6 (GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA) verwendet. Als Dezimaltrennzeichen in den Grafiken werden aufgrund des US-amerikanischen Ursprungs der Software Punkte verwendet. Die Daten dieser Arbeit werden als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM) angegeben. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit Hilfe des Student-t-Tests (t-Test) oder durch Varianzanalyse und ein Tukey *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant angesehen und das Signifikanzniveau wurde durch folgendes Symbol „\*“ gekennzeichnet. Dabei entspricht \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 und \*\*\*\*p<0,0001.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 CHARAKTERISIERUNG DER ADAMTS13-DEFIZIENTEN MÄUSE

#### 4.1.1 DNS-GENOTYPISIERUNG VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTPYMÄUSEN

Die Genotypisierungs-PCR dient dem Nachweis des Adamts13 Knockouts auf DNS Ebene.

Nach Revitalisierung der Adamts13-defizienten (Adamts13<sup>-/-</sup>) Embryonen und Anzucht der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wurde eine Genotypisierung durchgeführt, um zu prüfen, ob die Exone 3-6 des Adamts13 Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt wurden.

Wie in Abbildung 5 sichtbar, bildeten die Primer Adamts 5'F und Adamts 5'R1 bei Wildtyp Mäusen ein DNS-Fragment mit einer Größe von 616 Bp. Bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen ergaben die Primer Adamts 5'F und Adamts 5'R2 ein DNS-Fragment mit 350 Bp. Diese konnten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel mit Hilfe von GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid sichtbar gemacht werden.

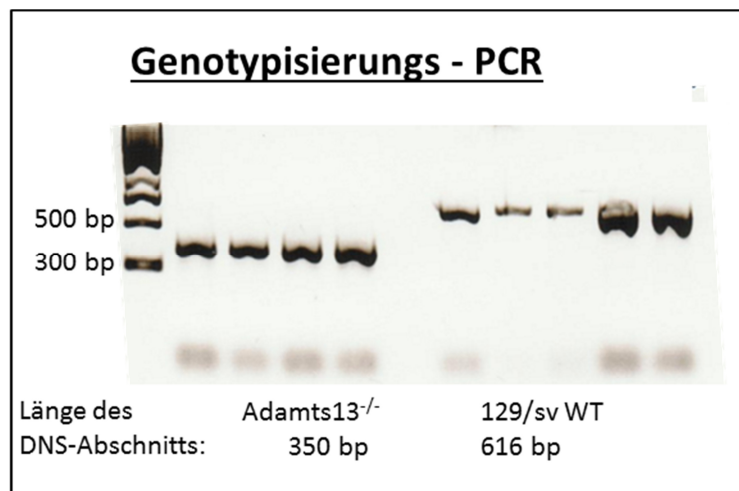


Abbildung 5: Repräsentative gelelektrophoretische Auftrennung der vervielfältigten DNS-Abschnitte des Adamts13-Gens von Wildtyp (129/Sv WT) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Größenstandard 100 Bp Ladder von New England Biosciences.

#### 4.1.2 RNS-GENOTYPISIERUNG VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTPYMÄUSEN MITTELS QRT-PCR

Um den Adamts13 Knockout auf RNS Ebene zu überprüfen, wurde eine qRT-PCR aus cDNS von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt.

## Ergebnisse

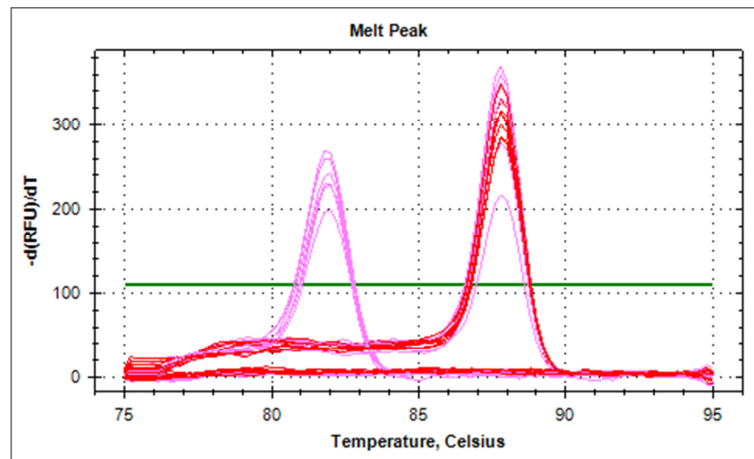


Abbildung 6: Schmelzkurve des Adamts13 (Peak des cDNS Fragments bei 82 °C) und L32 Abschnitts (Peak des cDNS Fragments bei 88 °C) aus Leber von Wildtyp (rosa) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Die Schwelle des Hintergrundrauschens ist durch die grüne Linie dargestellt.

Die Schmelzkurven der cDNS Fragmente für L32 und Adamts13 aus Leber von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen ist in Abbildung 6 in rot dargestellt. Bei 88 °C wurde jeweils ein Schmelzkurvenpeak für das L32-Fragment gemessen. Ein Fluoreszenzpeak bei 82 °C für das spezifische Adamts13 DNS-Fragment war nicht nachweisbar. Bei den Leberproben der Wildtyp Mäuse waren dagegen sowohl bei 88 °C als auch bei 82 °C spezifische Fluoreszenzpeaks messbar. Diese sind in Abbildung 6 als rosa Linien zu erkennen. Die fehlenden Peaks in der Schmelzkurve für das Adamts13 Fragment bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt somit, dass diese Mäuse keine Adamts13-RNS in der Leber gebildet hatten.

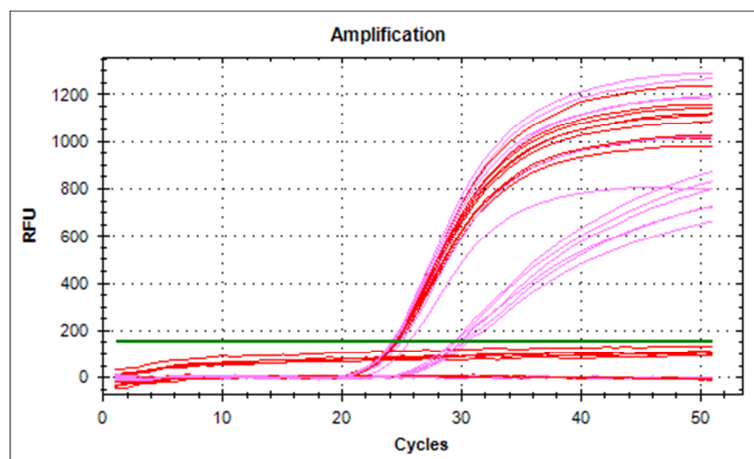


Abbildung 7: Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzemission bei 521 nm während der qRT-PCR für Adamts13 (Ct-Wert: 26 Zyklen) und L32 (Ct-Wert: 21,8 Zyklen) aus Leber von Wildtyp (rosa) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Der Anstieg der Fluoreszenzemission in den Leberproben von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen findet nicht statt (rote Kurven unterhalb der grünen Linie). Die Schwelle des Hintergrundrauschens ist durch die grüne Linie dargestellt.



## Ergebnisse

Ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals des L32-Fragments aus Leber von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen war nach 21,8 PCR Zyklen detektierbar. Für das Adamts13-Fragment begann der exponentielle Fluoreszenzanstieg nach 26 PCR Zyklen, wobei dies nur bei Leberproben aus Wildtyp-Mäusen der Fall war (Ct-Wert: 26 Zyklen) (Abb. 7). Für die Leberproben der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse war kein Anstieg des Fluoreszenzsignals messbar. Es fand somit keine Vervielfältigung des Adamts13-spezifischen cDNS-Fragments aus Leberproben von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen statt.

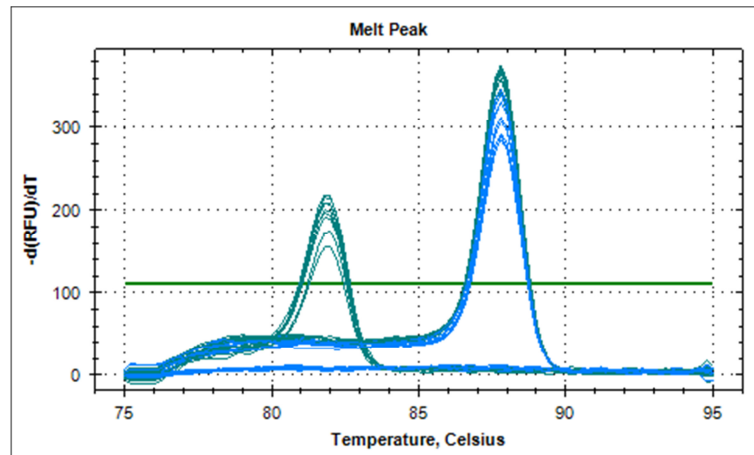


Abbildung 8: Schmelzkurve des Adamts13 (Peak des cDNS Fragments bei 82 °C) und L32 Abschnitts (Peak des cDNS Fragments bei 88 °C) aus Knochenmark von Wildtyp (grün) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (blau). Die Schwelle des Hintergrundrauschens ist durch die horizontale grüne Linie dargestellt.

Die Schmelzkurven der cDNS Fragmente für L32 und Adamts13 aus Knochenmark von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen sind in Abbildung 8 in blau dargestellt. Es konnte jeweils nur ein Peak bei 88 °C für das L32-Fragment gemessen werden. Ein Fluoreszenzpeak bei 82 °C für das spezifische Adamts13 DNS-Fragment war nicht nachweisbar. Bei den Knochenmark-Proben der Wildtyp Mäuse waren dagegen sowohl bei 88 °C als auch bei 82 °C spezifische Fluoreszenzpeaks messbar. Dies ist in der Abbildung 8 als grüne Linien zu erkennen. Die fehlende Schmelzkurve für das Adamts13 Fragment bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt somit, dass diese Mäuse keine Adamts13-RNS im Knochenmark gebildet hatten.

## Ergebnisse

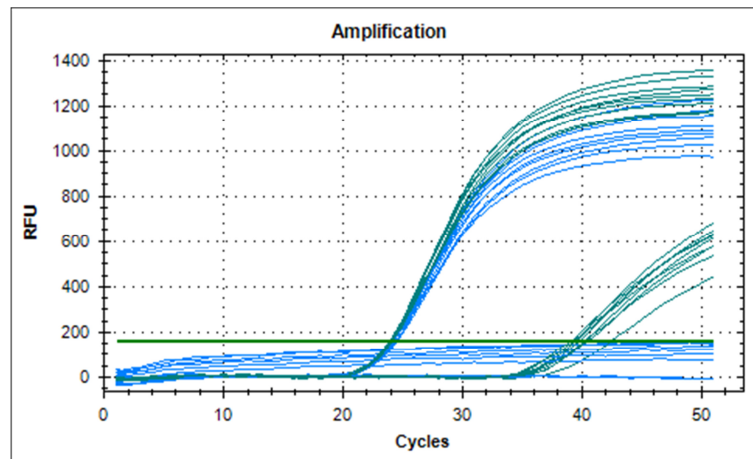


Abbildung 9: Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzemission bei 521 nm während der qRT-PCR für Adamts13 (Ct-Wert: 36,2 Zyklen) und L32 (Ct-Wert: 21,4 Zyklen) aus Knochenmark von Wildtyp (grün) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (blau). Der Anstieg der Fluoreszenzemission in den Leberproben von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen findet nicht statt (blaue Kurven unterhalb der grünen Linie). Die Schwelle des Hintergrundrauschens ist durch die grüne Linie dargestellt.

Ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals des L32-Fragments aus Knochenmark von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen war nach 21,4 PCR Zyklen detektierbar. Für das Adamts13-Fragment begann der exponentielle Fluoreszenzanstieg nach 36,2 PCR Zyklen, wobei dies nur bei Knochenmarksproben aus Wildtyp-Mäusen der Fall war (Abbildung 9). Für die Knochenmarksproben der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse war kein Anstieg des Fluoreszenzsignals messbar. Es fand somit keine Vervielfältigung des Adamts13-spezifischen cDNS-Fragments aus Knochenmark von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen statt.

Somit konnte auf RNS-Ebene bewiesen werden, dass die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl in der Leber als auch im Knochenmark kein Adamts13 bilden. Es handelt sich hierbei um einen qualitativen Nachweis von Adamts13-RNS. Eine Quantifizierung der Ergebnisse wurde auf Grund des vollständigen Fehlens von Adamts13 nicht durchgeführt.

### 4.1.3 ADAMTS13-AKTIVITÄTSVERGLEICH IM PLASMA VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTPMÄUSEN

Zur Etablierung des Adamts13 Aktivitäts Assays wurden, mit Hilfe des Standards des ACTIFLUOR™ ADAMTS13 activity kits (American Diagnostica GmbH) und dessen Verdünnungen, die in Abbildung 10 abgebildeten Standardgeraden erstellt.

## Ergebnisse

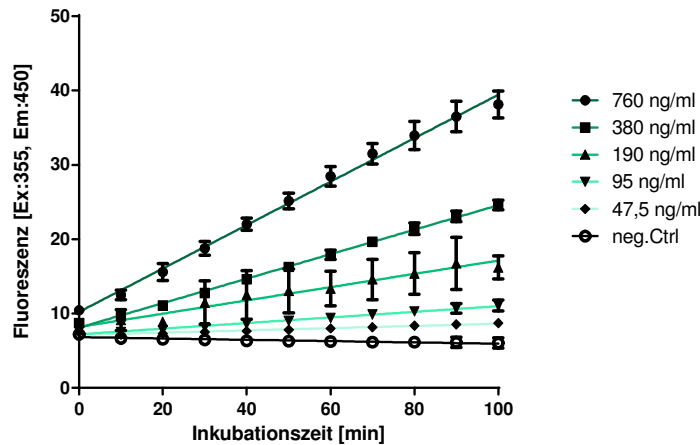


Abbildung 10: Standardgeraden des Adamts13-Aktivitätsassays. Linearer Anstieg der Fluoreszenzemission bei 450 nm des Standards (humanes Normalpoolplasma mit bekannter ADAMTS13-Konzentration von 760 ng/ml) und dessen Verdünnungen über 100 min. Als Negativ-Kontrolle (neg. Ctrl) wurde reiner Reaktionspuffer eingesetzt.

Anhand der Steigungen der Standardgeraden wurde die lineare Regressionsgerade angefertigt und mit der Gleichung dieser die unbekannten Adamts13-Aktivitäten der Mausplasma Proben berechnet (Abbildung 11).

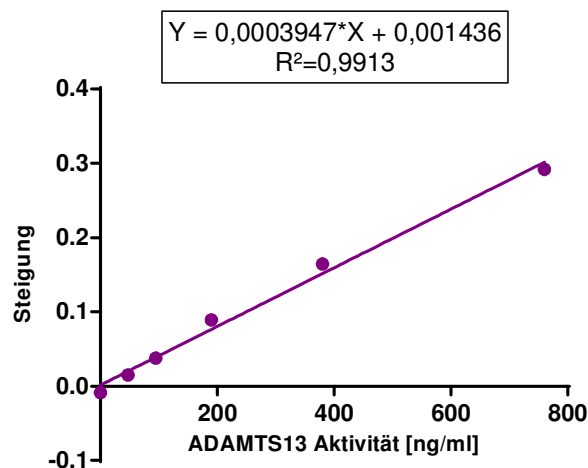


Abbildung 11: Lineare Regressionsgerade ermittelt aus den Steigungen der Standardgeraden. Die Gleichung dieser Geraden wurde für die Berechnung der unbekannten Adamts13-Aktivitäten der Mausplasma Proben verwendet.

Hieraus ergab sich eine mittlere Adamts13-Aktivität im Plasma von Wildtyp Mäusen von  $99,89 \text{ ng/ml} \pm 60,44 \text{ ng/ml}$ , wohingegen im Plasma der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse keine Adamts13-Aktivität gemessen werden konnte (Abbildung 12).

## Ergebnisse

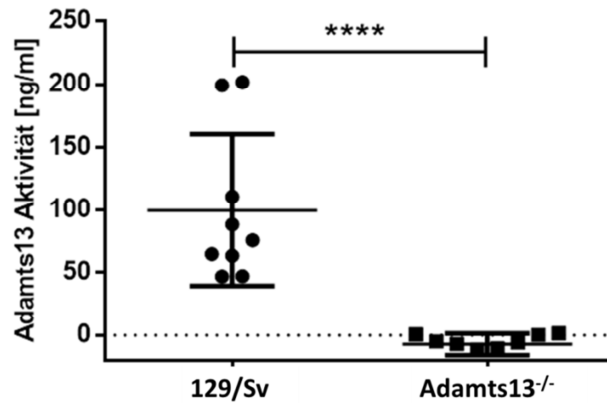


Abbildung 12: Vergleich der Adams13-Aktivität in Mausplasma von Wildtyp (129/Sv) und Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen. Der Mittelwert der Adams13 Aktivität im Plasma von Wildtypmäusen beträgt 99,89 ng/ml mit einem Standardfehler von  $\pm 60,44$  ng/ml. Im Plasma der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse wird der Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz nicht überschritten, sodass keine Aktivität nachweisbar ist.  $n \geq 8$ , t-Test: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.4 VWF-ANTIGEN VERGLEICH IM PLASMA VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTYPMÄUSEN

Der VWF ist bisher das einzige bekannte Substrat der Adamts13-Protease. Um zu prüfen, ob sich die ADAMTS13-Defizienz auf die VWF-Konzentration im Blut von Mäusen auswirkt, wurde der VWF-Antigen Gehalt der Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen.

Durch entsprechende 1:2 Verdünnungen des Standardplasmas (humane EDTA-Plasmaprobe mit bekanntem VWF:AG Gehalt: 1015 mU/ml) wurde eine Standardgerade zwischen 0 und 10 mU/ml VWF:AG erstellt (Abbildung 13). Die Gleichung der Geraden wurde zur Berechnung der unbekannten Mausplasma VWF:AG Konzentrationen verwendet.

## Ergebnisse

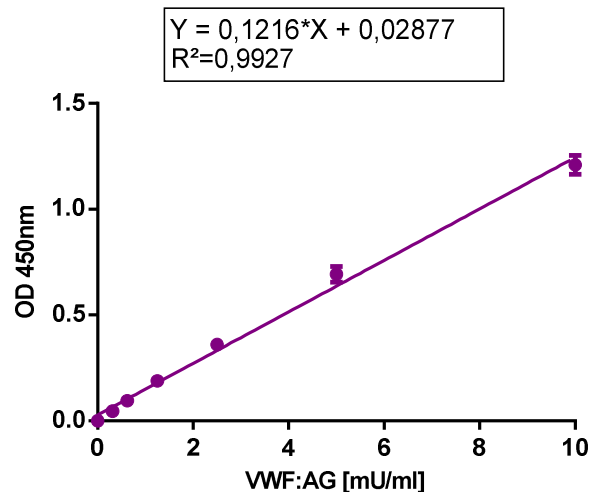


Abbildung 13: Lineare Regressionsgerade ermittelt aus den OD (optische Dichte) Werten der Verdünnungsreihe aus humanem EDTA-Plasma mit bekanntem VWF:AG Gehalt. Die Gleichung der Geraden wurde zur Berechnung der unbekannten VWF:AG Konzentrationen der Mausplasma Proben verwendet (n=3).

Sowohl die Adamts13<sup>-/-</sup> als auch die 129/Sv Mäuse zeigten einen VWF:AG Gehalt zwischen 300 und 400 mU/ml im Plasma (Abbildung 14). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen werden.

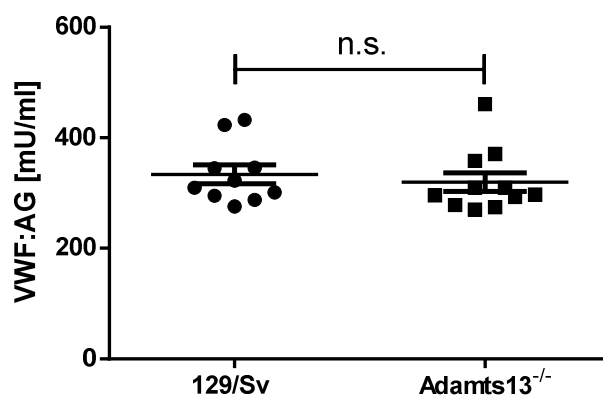


Abbildung 14: Dot-Plot der VWF:AG Konzentrationen im Plasma von Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierbei zeigten die Wildtyp Mäuse (n=10) einen mittleren VWF:AG Gehalt von 333,9 mU/ml ± 17, 23 mU/ml (SEM) und die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=11) einen mittleren VWF:AG Gehalt von 319,8 mU/ml ± 17,13 mU/ml (SEM), sodass kein signifikanter Unterschied im VWF:AG Gehalt zwischen den beiden Gruppen bestand. t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte ± SEM.

### 4.1.5 VWF-MULTIMERSTRUKTURVERGLEICH IM PLASMA VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTYPMÄUSEN

Die VWF Multimeranalyse liefert Informationen über Konformationsänderungen des VWFs.

## Ergebnisse

Die Einteilung des Multimerenmusters erfolgt anhand der Anzahl an Dimeren (Abbildung 15). Kleine Multimere bestehen aus 1-5 Dimeren, mittelgroße aus 6-10, große aus 10-20 und ultralange Multimere bestehen aus über 20 Dimeren.

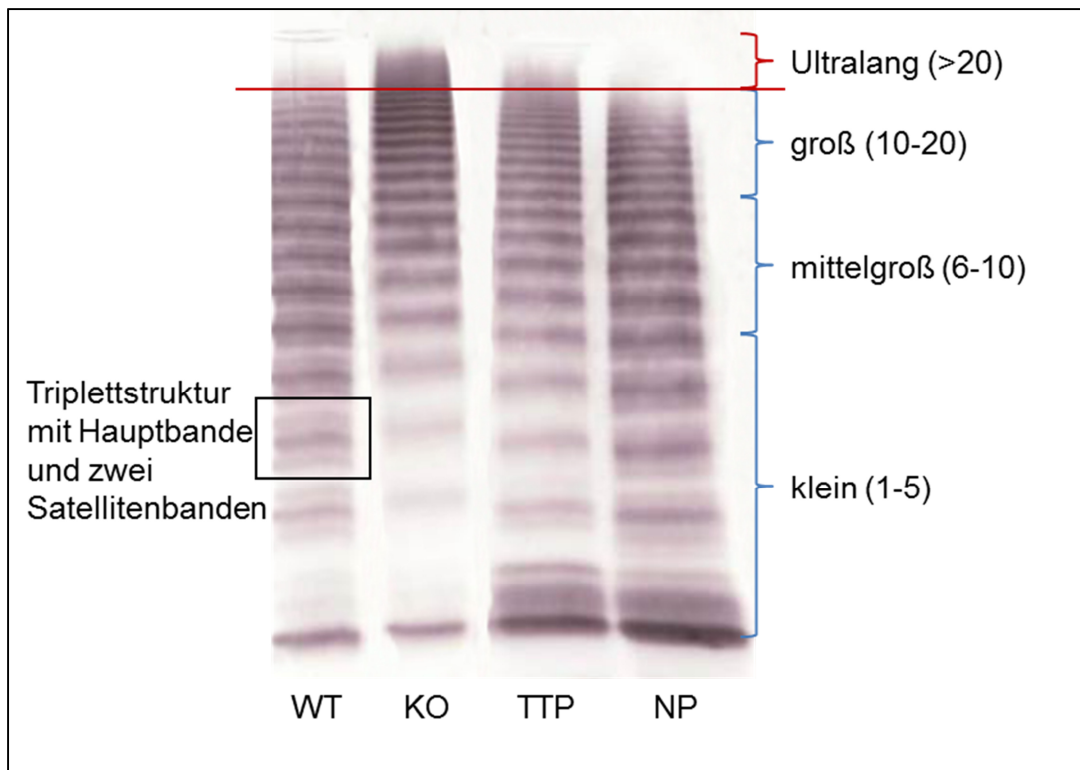


Abbildung 15: Einteilung der VWF Multimere und repräsentativer Vergleich des Multimerenmusters eines TTP-Patienten (TTP) mit humanem Normalpoolplasma (NP) und Plasma einer Wildtyp (WT) Maus mit Plasma einer Adamts13<sup>-/-</sup> (KO) Maus in einem 1% Agarosegel.

Die typische Tripletstruktur im VWF Multimerenmuster entsteht durch die Spaltung des VWFs durch Adamts13 und besteht aus einer Hauptbande und zwei Satellitenbanden (Abbildung 15). Sie war bei Normalpoolplasma (NP) sowie bei WT Plasma deutlich zu erkennen, wobei sie bei der Plasmaprobe des TTP-Patienten nur schwach zu erkennen war und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Plasma fehlte. Ultralange Multimere waren im KO Plasma am stärksten vorhanden und im Plasma von WT Maus und TTP-Patient in geringerer Menge ebenfalls nachweisbar (Abbildung 15 und Abbildung 16).

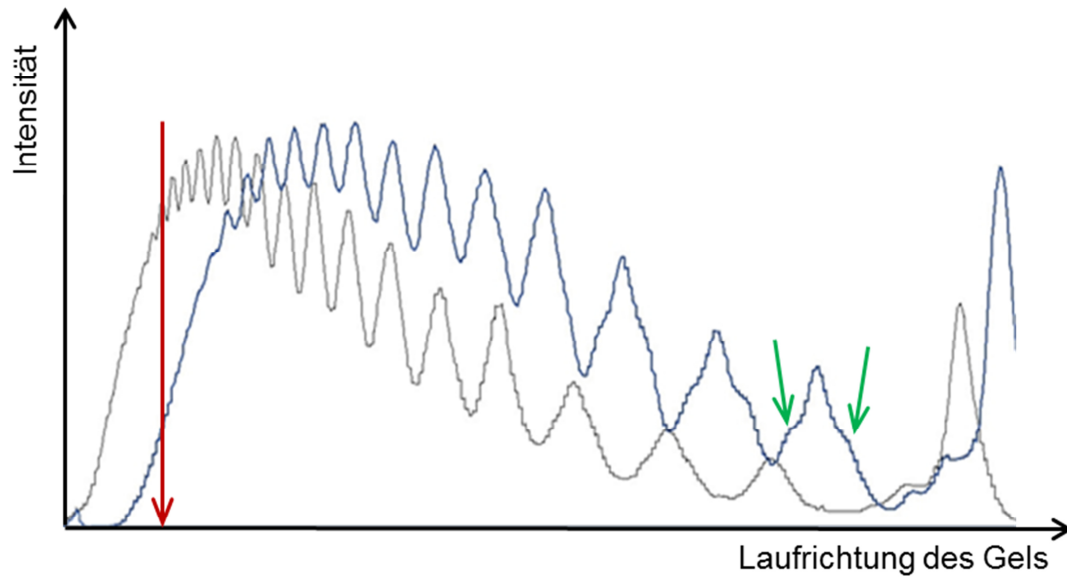


Abbildung 16: Repräsentative densitometrische Darstellung der VWF Multimere im Plasma einer Wildtyp (WT) Maus und einer Adamts13<sup>-/-</sup> (KO) Maus in einem 1% Agarosegel. Die Laufrichtung ist von links nach rechts (d.h. die großen Multimere befinden sich im linken Anteil). Blau = WT Plasma, grau = KO-Plasma. Der rote Pfeil markiert die Grenze zwischen den großen (10-20) und ultralangen (>20) Multimeren. Die grünen Pfeile markieren die typischen Schultern der Tripletstruktur.

In Abbildung 17 sind mehrere Adamts13<sup>-/-</sup> Plasmaproben im Vergleich zu Wildtyp (129/Sv) Plasma in einem 1% Agarosegel dargestellt. Zur leichteren Orientierung wurde außerdem NP und Plasma eines TTP Patienten (TTP) mit aufgetragen. Es handelte sich hierbei um Plasmaproben von unbehandelten Mäusen. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen größere Multimere im Plasma auf als die Wildtyp Mäuse, die jedoch bei beiden im Bereich der ultralangen Multimere lagen. Eine Tripletstruktur war sowohl bei Adamts13<sup>-/-</sup> als auch bei Wildtyp Mäusen zu erkennen. Diese war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als in humanem Normalpoolplasma.

## Ergebnisse

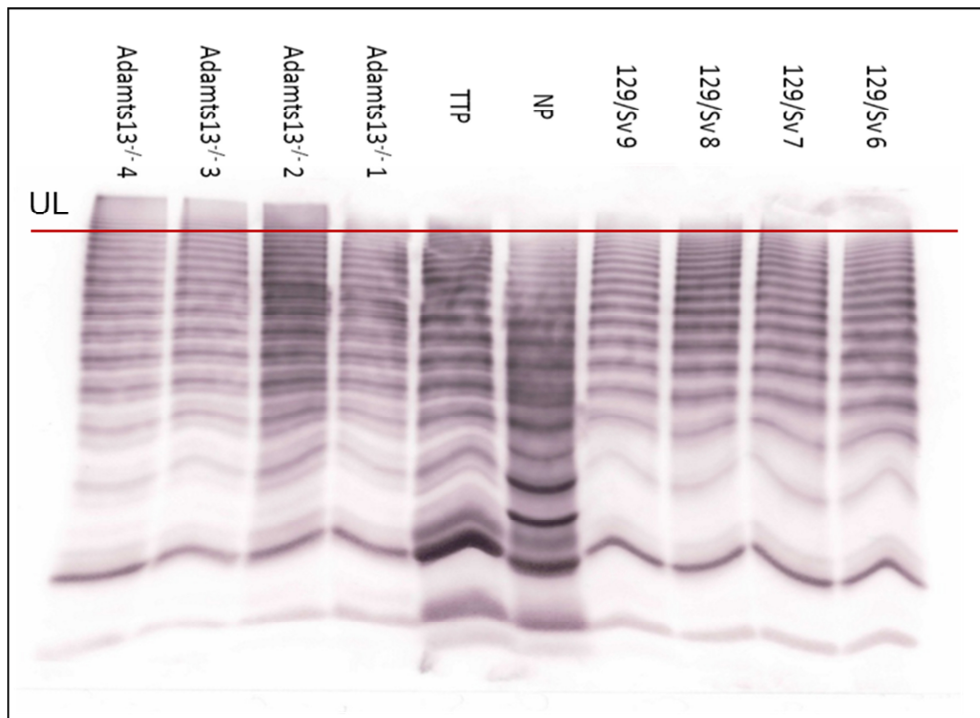


Abbildung 17: VWF Multimermuster von jeweils 4 Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäusen in einem 1% Agarosegel im Vergleich zu Normalpoolplasma (NP) und Plasma eines TTP-Patienten (TTP).

Die rote Linie markiert die Grenze zwischen großen und ultrlangen (UL) VWF Multimeren.

### 4.1.6 VERGLEICH DER BLUTBILDER VON ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTPMÄUSEN

Ein starker Abfall der Thrombozytenzahl im Blut von TTP Patienten ist ein wichtiges Anzeichen eines akuten TTP-Schubes. Des Weiteren kommt es zu einem Abfall des Hämoglobins und des Hämatokrits im Blut dieser Patienten. Um sicher auszuschließen, dass die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse nicht schon in unbehandeltem Zustand TTP-ähnliche Veränderungen des Blutbildes aufweisen, wurden diese Werte zunächst verglichen. Die mittlere Thrombozytenzahl betrug bei Wildtyp Mäusen  $824,9 \pm 13,89 \times 10^3/\mu\text{l}$  und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen  $897,9 \pm 15,34 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Abbildung 18). Die Wildtyp Mäuse hatten einen mittleren Hämoglobingehalt von 15,45 g/dl und die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse 14,96 g/dl (Abbildung 19). In Abbildung 20 ist der Hämatokrit der Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse dargestellt. Der Mittelwert des Hämatokrits der Wildtyp Mäuse lag bei 55,28%. Bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen betrug er 54,24%. Es konnten somit keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenzahl, des Hämatokrits und des Hämoglobingehalts zwischen unbehandelten Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hatten eine Leukozytenzahl mit einem Mittelwert von  $5,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Die mittlere Leukozytenzahl der Wildtyp Mäuse betrug  $5,9 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Abbildung 21). Auch hier konnte somit kein signifikanter Unterschied gemessen werden.



## Ergebnisse

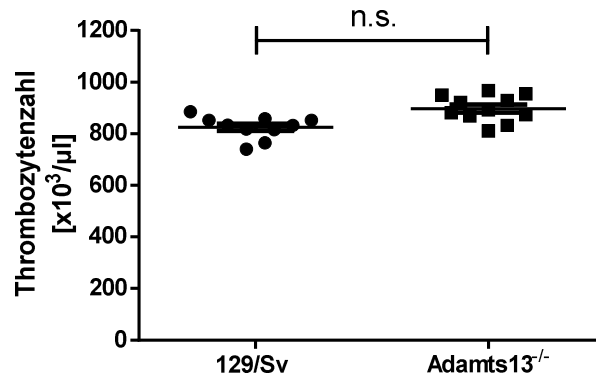


Abbildung 18: Dot-Plot der Thrombozytenzahlen in EDTA-Blut von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=11) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=10). Die mittlere Thrombozytenzahl betrug bei Wildtyp Mäusen  $824,9 \pm 13,89 \times 10^3/\mu\text{l}$  (SEM) und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen  $897,9 \pm 15,34 \times 10^3/\mu\text{l}$  (SEM). t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

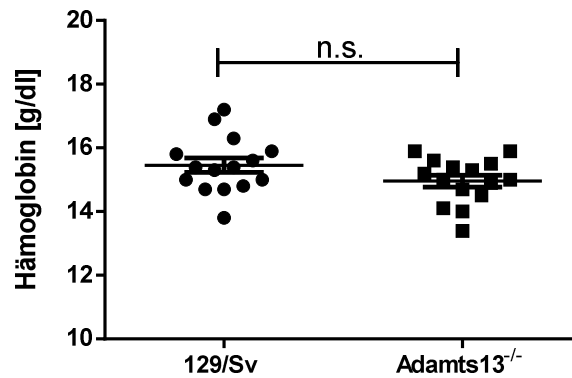


Abbildung 19: Dot-Plot des Hämoglobingehalts in EDTA-Blut von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=15) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=15). Der Mittelwert des Hämoglobingehalts betrug bei Wildtyp Mäusen  $15,45 \pm 0,88 \text{ g/dl}$  (SEM) und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen  $14,96 \pm 0,72 \text{ g/dl}$  (SEM). t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ergebnisse

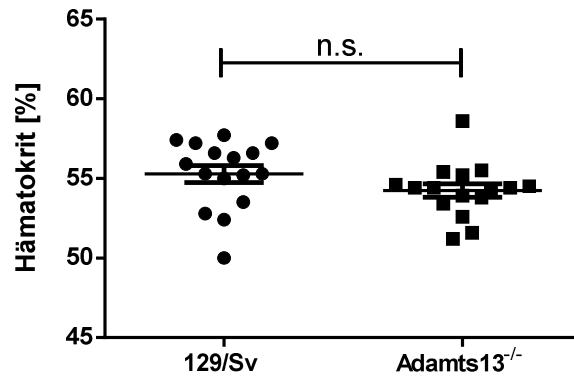


Abbildung 20: Dot-Plot des Hämatokrits in EDTA-Blut von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=16) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=16). Der Mittelwert des Hämatokrits betrug bei Wildtyp Mäusen 55,28 ± 2,13 % (SEM) und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen 54,24 ± 1,69 % (SEM). t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte ± SEM.

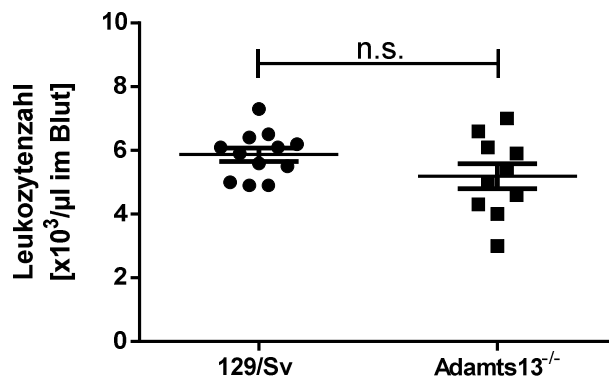


Abbildung 21: Dot-Plot der Leukozytenzahlen im EDTA-Blut von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=10) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=12). Die mittlere Leukozytenzahl betrug bei Wildtyp Mäusen 5,87 ± 0,73 x 10<sup>3</sup>/µl (SEM) und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen 5,19 ± 1,25 x 10<sup>3</sup>/µl (SEM). t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte ± SEM.

## 4.2 ÜBERPRÜFUNG DES PROTHROMBOTISCHEN STATUS DER ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSE

Banno et al. [2], die 2006 die Adamts13-defizienten Mäuse auf einem 129/Sv Hintergrund entwickelt und gezüchtet haben, zeigten, dass diese Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen einen prothrombotischen Status aufwiesen. Um den prothrombotischen Status zu überprüfen, wiederholten wir dieses Experiment mit unseren Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen. Auch hier konnte der prothrombotische Status der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit einem mittleren Thrombozytenverbrauch von 82,66% nachgewiesen werden. Die entsprechenden Wildtyp Mäuse verbrauchten dagegen nur 78,84% Thrombozyten (Abbildung 22).

## Ergebnisse

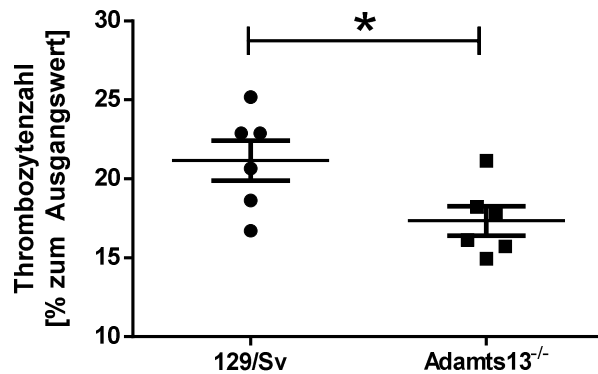


Abbildung 22: Dot-Plot des Thrombozytenverbrauchs in einem *in vivo* Thrombose Modell. Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=6) zeigten einen erhöhten Thrombozytenverbrauch (verbleibende Thrombozytenzahl 17,34%) nach Stimulation mit 600 ng/g Körpergewicht (KGW) Kollagen und 60 ng/g KGW Epinephrin. Dieser fiel bei Wildtyp Mäusen (129/Sv) signifikant geringer aus mit einer verbleibenden Thrombozytenzahl von 21,16 % (n=6). t-Test: \* p<0,05. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.3 ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSE ALS MODELL FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER ANGEBORENEN TTP: AUSLÖSUNG DER TTP DURCH I.V. INJEKTION VON 2000 VWF:RCoU/KG KGW DES rhVWF

Schiviz et al. [123] hatten im Frühjahr 2012 ein neues Mausmodell zur Untersuchung der TTP beschrieben.

Auch unsere Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten 8 h nach Injektion von 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF TTP-typische Symptome mit starkem Thrombozytenabfall von  $806,0 \pm 45,83 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $52,67 \pm 7,67 \times 10^3/\mu\text{l}$  (n=9), wobei die Thrombozytenzahlen der Wildtyp Mäuse lediglich von  $734,3 \pm 27,71 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $482,6 \pm 14,95 \times 10^3/\mu\text{l}$  (n=8) absank (Abbildung 23 und Abbildung 24).

## Ergebnisse

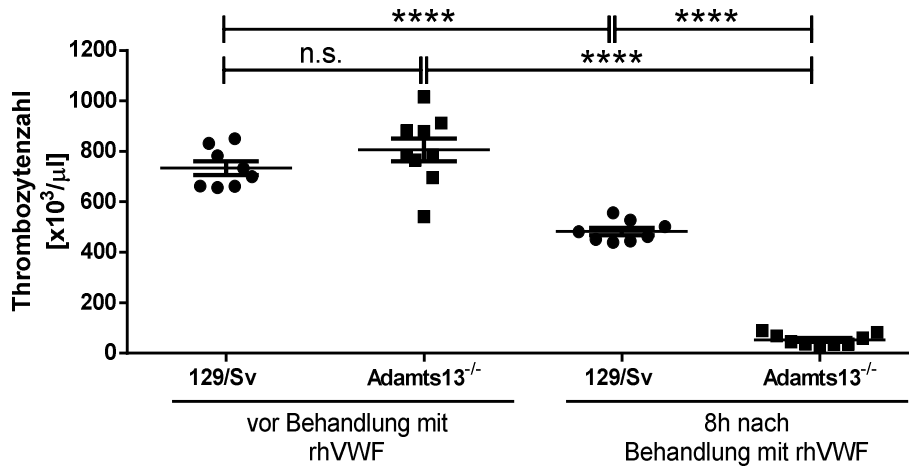


Abbildung 23: Dot-Plot der Thrombozytenzahlen der Adamts13<sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 RCoU/kg KGW des rhVWF. Die Ausgangswerte der beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (n.s.) voneinander, wobei die Thrombozytenwerte der zwei Gruppen nach Behandlung stark differierten. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hatten nach der Behandlung eine Thrombozytenzahl von lediglich  $52,67 \pm 7,67 \times 10^3/\mu\text{l}$  (SEM). Die Wildtyp Mäuse hatten dagegen noch eine Thrombozytenzahl von  $482,6 \pm 14,95 \times 10^3/\mu\text{l}$  (SEM). Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*\*\*\* p<0,0001. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

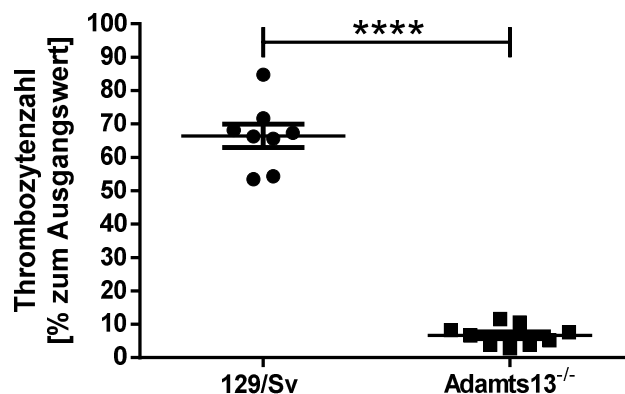


Abbildung 24: Vergleich der verbleibenden Thrombozytenzahlen in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 RCoU/kg KGW des rhVWF. Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=9) zeigten noch eine Thrombozytenzahl von  $6,72 \pm 1,03\%$  (SEM), wohingegen Wildtyp Mäuse (129/Sv) (n=8) noch eine Thrombozytenzahl von  $66,47 \pm 3,49\%$  (SEM) aufwiesen. t-Test: \*\*\*\* p<0,0001. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM als Dot-Plot.

Der Hämatokrit der Mäuse unterschied sich schon zu Beginn geringgradig zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Beide Gruppen zeigten einen Abfall des Hämatokrits nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF um ca. 15% zum Ausgangswert (129/Sv-Wildtyp Mäuse:  $16,59 \pm 1,68$ ; n=8 und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse:  $14,14 \pm 2,49$ ; n=9) (Abbildung 25 und Abbildung 26).

## Ergebnisse

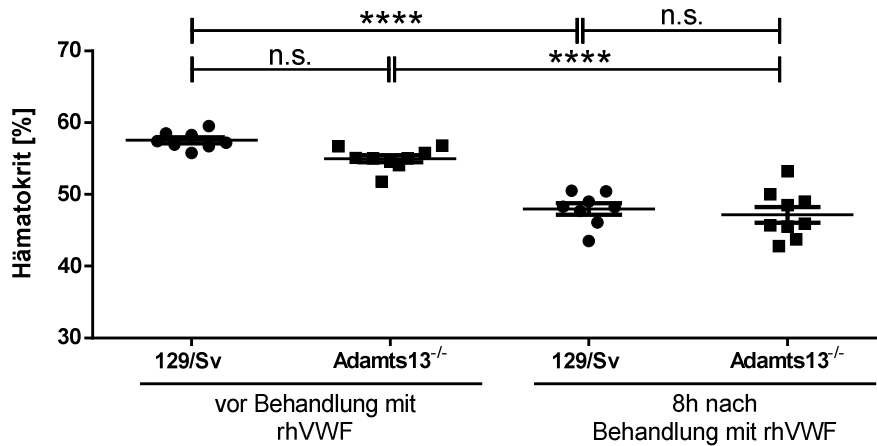


Abbildung 25: Hämatokrit der Adamts13<sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Die Ausgangswerte der beiden Gruppen unterschieden sich geringgradig, aber signifikant vor der Behandlung. Beide Gruppen zeigten einen signifikanten Abfall des Hämatokrits 8h nach Behandlung. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: n.s.=nicht signifikant, \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

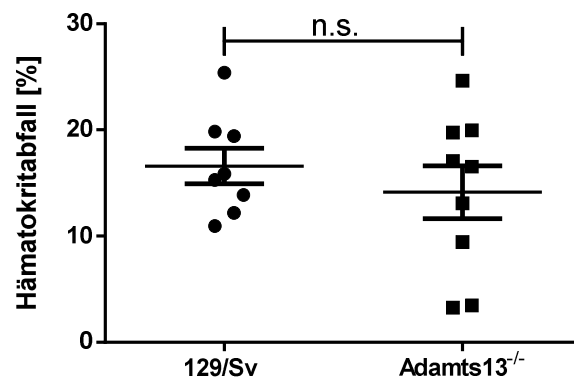


Abbildung 26: Vergleich des Hämatokritabfalls in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Beide Gruppen zeigten einen vergleichbaren Hämatokritabfall von ca. 15% und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM als Dot-Plot.

Die Veränderungen des Hämatokrits im Blut der Mäuse spiegelten sich auch im Hämoglobinwert wider. Der Hämoglobinwert der Mäuse unterschied sich ebenfalls zu Beginn geringgradig zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Beide Gruppen zeigten einen Abfall des Hämoglobins nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF von ca. 13% zum Ausgangswert (Abbildung 27 und Abbildung 28).

## Ergebnisse

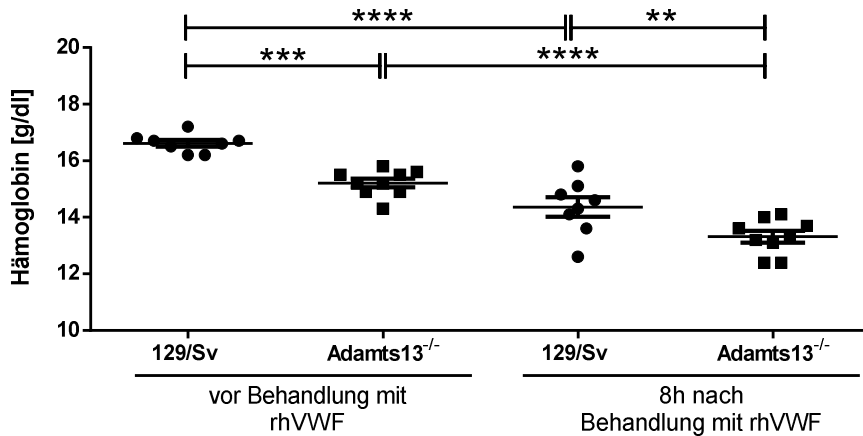


Abbildung 27: Hämoglobinwerte der Adamts13<sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Die Ausgangswerte der beiden Gruppen unterschieden sich bereits vor der Behandlung signifikant. Beide Gruppen zeigten einen signifikanten Abfall des Hämatokrits 8h nach Behandlung. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

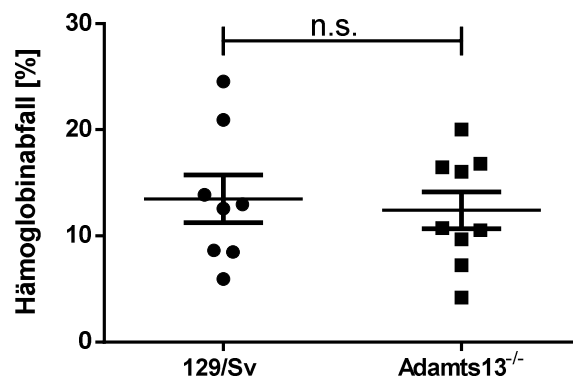


Abbildung 28: Vergleich des Hämoglobinabfalls in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Beide Gruppen zeigten einen vergleichbaren Hämatokritabfall von ca. 13% und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM als Dot-Plot.

Die intravenöse Injektion von 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF führte zu einem enormen VWF:AG Anstieg im Blut der Mäuse von 330 mU/ml auf bis zu 25000 mU/ml. Beide Versuchsgruppen hatten einen mittleren basalen VWF:AG Gehalt von ca. 325 mU/ml. Nach Injektion des rhVWFs stieg der VWF:AG Gehalt im Blut der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse auf einen mittleren VWF:AG Gehalt von 17,88 U/ml. Die Wildtyp Mäuse hatten einen weniger starken Anstieg des VWF:AG Gehalts auf 13,01 U/ml (Abbildung 29 und Abbildung 30).

## Ergebnisse

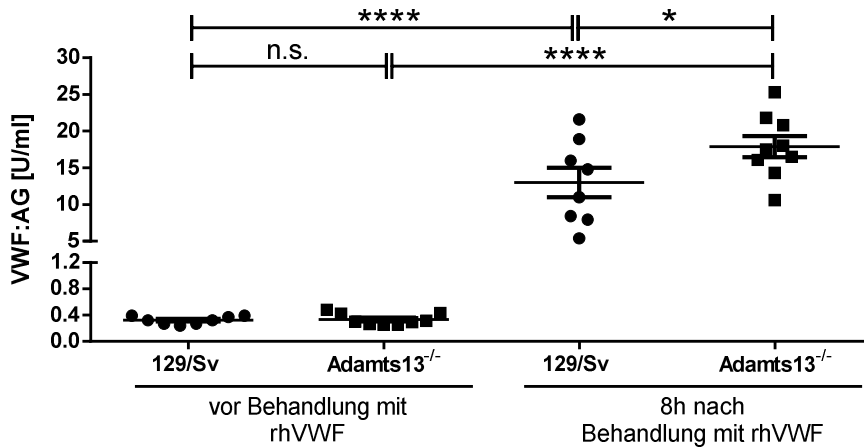


Abbildung 29: VWF:AG Konzentrationen der Adamts13<sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Die basale VWF:AG Konzentration betrug 0,332 U/ml bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen und 0,321 U/ml bei den Wildtyp (129/Sv) Mäusen. Nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF stieg die VWF:AG Konzentration bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auf einen Mittelwert von 17,88 U/ml und 13,01 U/ml bei den Wildtyp Mäusen. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*p<0,05, \*\*\*\* p<0,0001, n.s.= nicht signifikant. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte ± SEM als Dot-Plot.

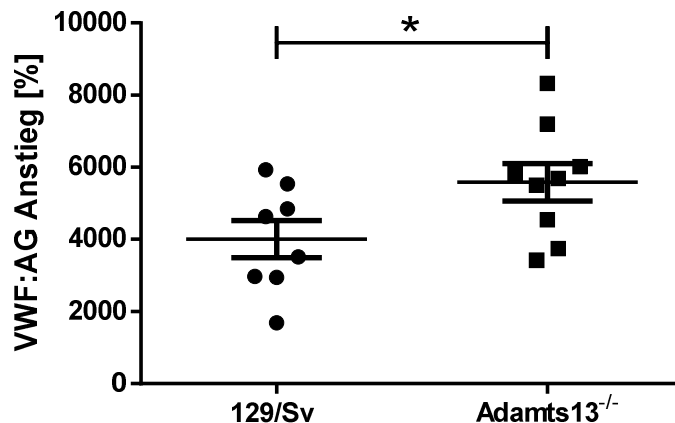


Abbildung 30: Vergleich des VWF:AG Anstiegs in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Beide Gruppen zeigten einen sehr starken VWF:AG Anstieg. Er betrug bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=9) 5586 ± 520,8% (SEM), bei den Wildtyp Mäusen (129/Sv) (n=8) dagegen nur 4007 ± 516,6% (SEM). t-Test: \* p<0,05. Dargestellt sind alle gemessenen Werte inklusive der Mittelwerte ± SEM als Dot-Plot.

Die nach Pappenheim gefärbten Blutausstriche vor und nach Behandlung der Mäuse mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF zeigten das vermehrte Auftreten von Fragmentozyten, die jedoch nur bei den behandelten Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden konnten. Auch der starke Abfall der Thrombozytenzahlen bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen war in den Blutausstrichen zu erkennen (Abbildung 31).

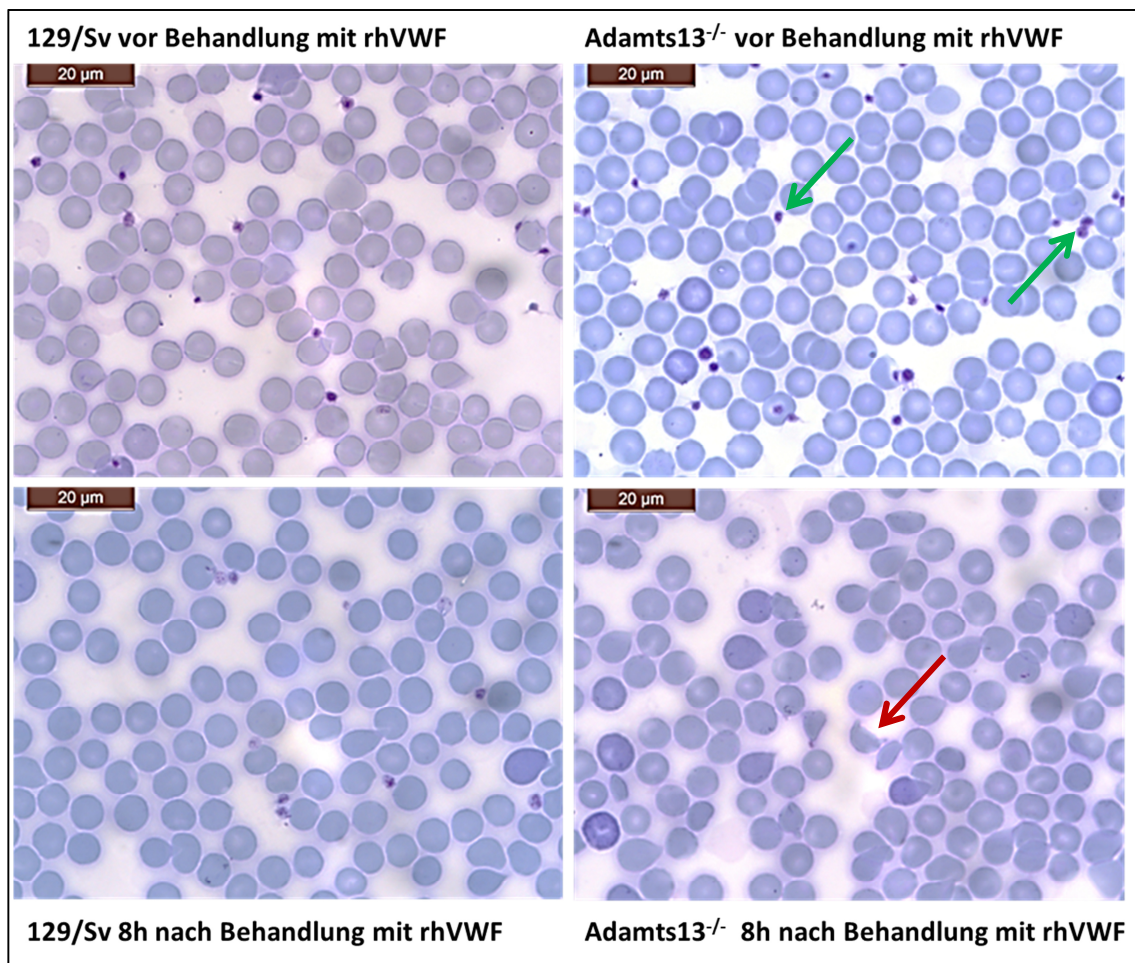


Abbildung 31: Repräsentative Blutausstriche von je einer Wildtyp (129/Sv) und einer Adamts13<sup>-/-</sup> Maus vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF. Der rote Pfeil markiert Fragmentozyten, die grünen Pfeile markieren Thrombozyten. Pappenheim-Färbung, Vergrößerung: 1000-fach mit Ölimmersion.

#### 4.4 EIN HUMANES VWF KONZENTRAT LÖST KEINEN THROMBOZYTENABFALL IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN AUS, AUCH NICHT IN SEHR HOHER DOSIERUNG

Nachdem rhVWF als Trigger für TTP in ADAMTS13-defizienten Mäusen nachgewiesen werden konnte, sollte dies auch mit einem humanen VWF-Konzentrat (Wilfactin®) überprüft werden.

Das humane VWF-Konzentrat konnte jedoch sowohl in derselben Dosierung von 2000 VWF:RCoU/kg KGW als auch in doppelter Dosis von 4000 VWF:RCoU/kg KGW keinen TTP-typischen Thrombozytenabfall in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auslösen (Abbildung 32).



## Ergebnisse

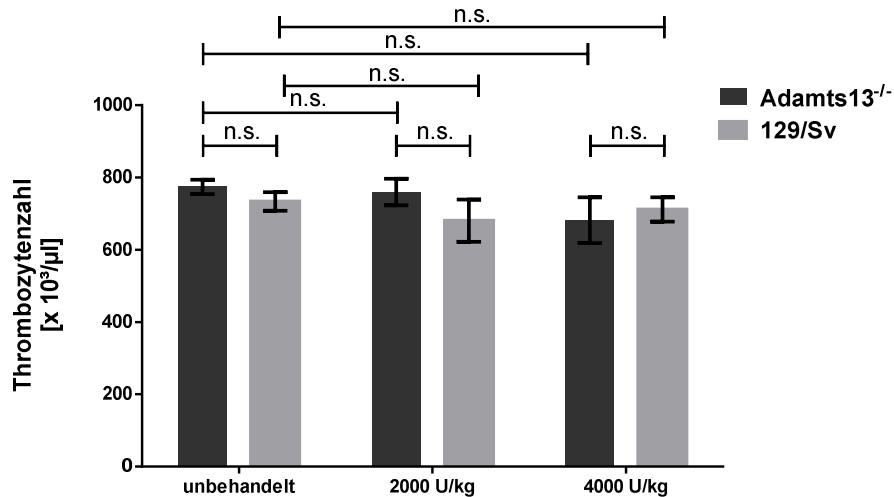


Abbildung 32: Thrombozytenzahlen der Adamts13<sup>-/-</sup> ( $n \geq 3$ ) und Wildtyp (129/Sv) ( $n \geq 3$ ) Mäuse vor (unbehandelt) und 8h nach Behandlung mit 2000 (2000U/kg) bzw. 4000 (4000U/kg) VWF:RCoU/kg KGW des VWF-Konzentrats (Wilfactin®). Die Thrombozytenzahlen bewegten sich bei beiden Versuchsgruppen weder bei 2000 noch bei 4000 U/kg außerhalb des Referenzbereichs von  $600 - 900 \times 10^6 /\mu\text{l}$ . Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die intravenöse Injektion von 2000 VWF:RCoU/kg KGW (Wilfactin®) führte zu einem geringeren VWF:AG Anstieg im Vergleich zu rhVWF. Die basale VWF:AG Konzentration von durchschnittlich 360 mU/ml stieg auf maximal 17000 mU/ml. Nach Injektion des humanen VWF-Konzentrats erreichte der VWF:AG Gehalt im Blut der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse einen mittleren VWF:AG Gehalt von 6,2 U/ml. Die Wildtyp Mäuse hatten einen stärkeren Anstieg des VWF:AG Gehalts auf 11,7 U/ml (Abbildung 33).

## Ergebnisse

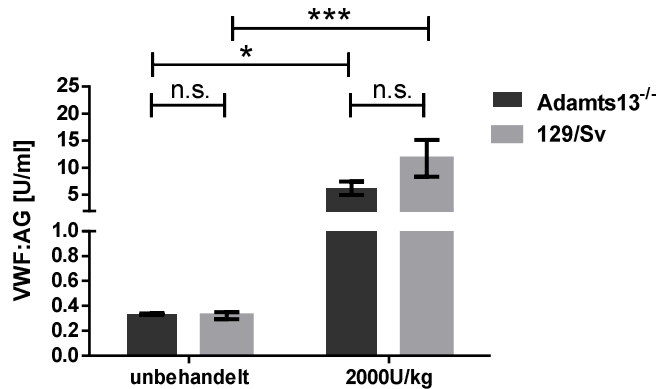


Abbildung 33: VWF:AG Konzentrationen der Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 (2000U/kg) VWF:RCoU/kg KGW des VWF-Konzentrats (Wilfactin®). Die basale VWF:AG Konzentration betrug  $0,33 \pm 0,007$  U/ml (SEM) bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=5) und  $0,32 \pm 0,028$  U/ml (SEM) bei den Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=5). Nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg Wilfactin® stieg der VWF:AG Gehalt bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=3) auf einen Mittelwert von  $6,2 \pm 1,24$  U/ml (SEM) und  $11,7 \pm 3,40$  U/ml (SEM) bei den Wildtyp Mäusen (n=3). Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.5 VERGLEICH DES MULTIMERMUSTERS VON rhVWF UND ISOLIERTEM HUMANEM VWF

Die Herstellung des rekombinanten VWFs erfolgte in Hamster Ovarienzellen [146], wohingegen das humane VWF Konzentrat durch Aufreinigung des VWFs aus menschlichem Plasma erfolgte [147]. Ein großer Unterschied ist hierbei, dass der biotechnologisch hergestellte VWF im Gegensatz zu plasmatischem VWF keinen Kontakt zu ADAMTS13 hat und somit auch keine ADAMTS13-bedingten Spaltprodukte des VWFs hierbei vorliegen. Dies führt zu einer deutlichen Abweichung des Multimermusters des rhVWFs von plasmatischem VWF. Im 1% Agarosegel konnte im Multimermuster des rhVWFs das Vorhandensein von ultralangen Multimeren und das Fehlen der Tripletstruktur nachgewiesen werden. Das Multimermuster des plasmatischen VWFs dagegen wies eine deutlich erkennbare Tripletstruktur auf, wohingegen ultralange Multimere nicht nachweisbar waren. Somit entsprach das Multimermuster des plasmatischen VWFs der Multimerstruktur von Normalpoolplasma [147] (Abbildung 34 und Abbildung 35).

## Ergebnisse

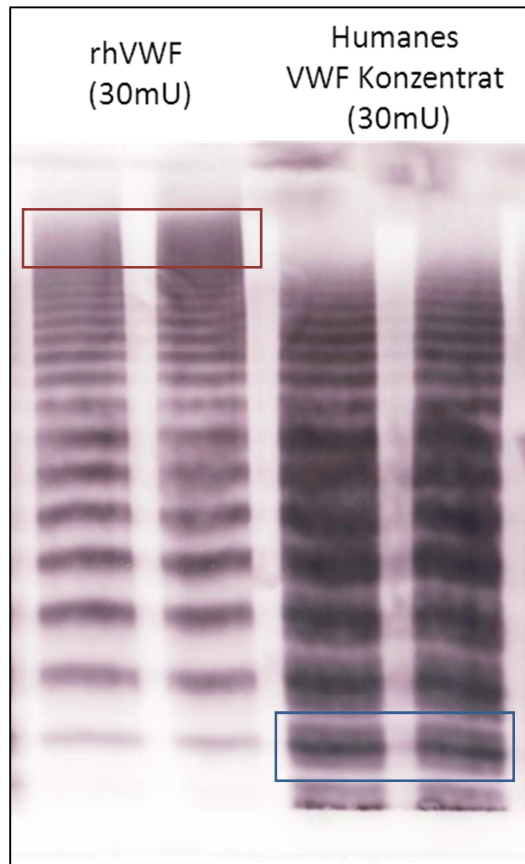


Abbildung 34: VWF Multimermuster von jeweils 2 Proben mit rhVWF und mit humanem VWF Konzentrat in einem 1% Agarosegel. Beide Proben wurden auf eine VWF:RCo Konzentration von 30mU/ml eingestellt. Im Multimermuster des rhVWFs ist keine Tripletstruktur zu erkennen, jedoch ultralange Multimere (roter Kasten). In humanem VWF Konzentrat ist das Tripletmuster klar zu erkennen (blauer Kasten). Ultralange Multimere liegen nicht vor.

## Ergebnisse

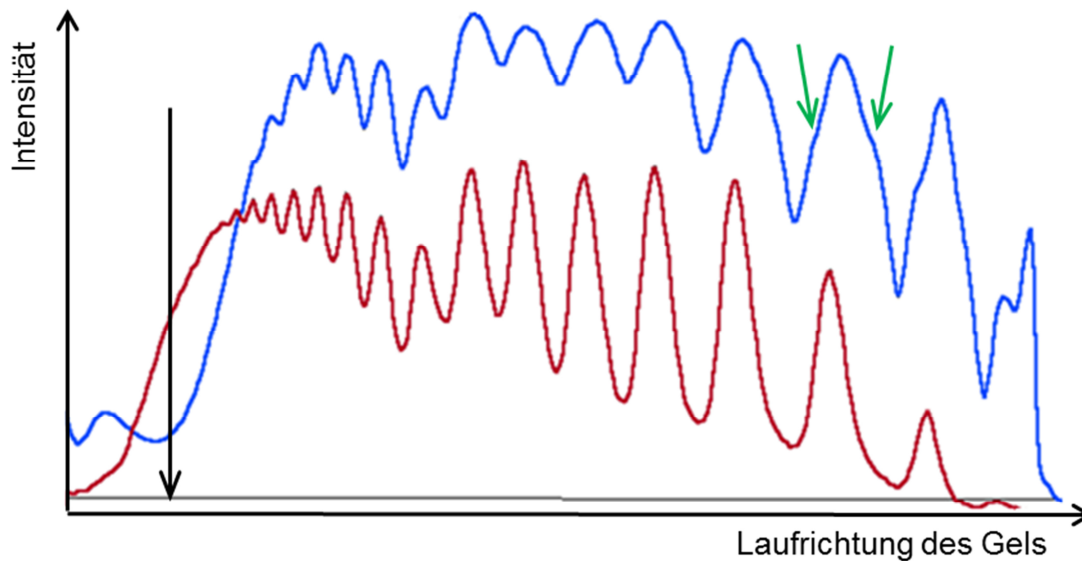


Abbildung 35: Densitometrische Darstellung der VWF Multimere eines humanen VWF Konzentrats (blau) und des rekombinanten humanen VWFs (rot) in einem 1% Agarosegel. Die Laufrichtung ist von links nach rechts. Die grünen Pfeile zeigen die typischen Schultern der Triplettsstruktur an. Der schwarze Pfeil markiert die Grenze zwischen großen (10-20) und ultralangen (>20) Multimeren.

### 4.6 ERHÖHUNG DES ENDOGENEN VWF-PLASMASPIEGELS MITTELS HISTAMININJEKTION LÖST KEINEN THROMBOZYTENABFALL IN MÄUSEN AUS

Da eine massive Erhöhung des VWF:AG Gehalts mit rhVWF im Blut der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse innerhalb weniger Stunden zur Auslösung TTP-typischer Symptome führt, sollte mit Histamin überprüft werden, wie die Mäuse auf eine Erhöhung des endogenen VWF:AG Gehalts reagieren.

Hierfür wurde zunächst der VWF:AG Gehalt bei unbehandelten Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyp Mäusen gemessen und verglichen. Der Mittelwert des VWF:AG Gehalts der unbehandelten Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen betrug 319,8 mU/ml mit einer Streuung von 270 bis 460 mU/ml. Die 129/Sv Wildtyp Mäuse (n=10) hatten einen mittleren VWF:AG Gehalt von 333,9 mU/ml mit dem niedrigsten VWF:AG Wert von 275,7 mU/ml und dem höchsten VWF:AG Wert von 432,3 mU/ml. Somit zeigten beide Versuchsgruppen den gleichen basalen VWF:AG Gehalt im Blut (Abbildung 36).

## Ergebnisse

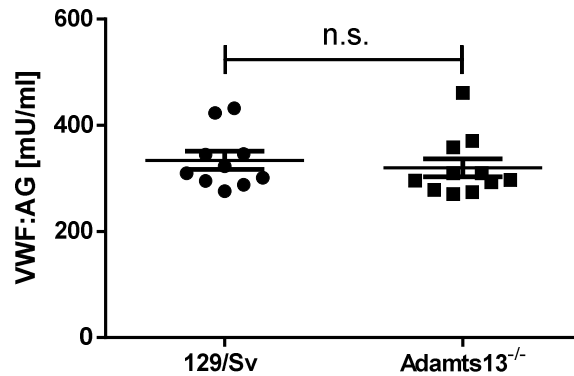


Abbildung 36: Vergleich des basalen VWF:AG Gehalts bei 129/Sv Wildtyp Mäusen (n=10) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=11). Der Mittelwert des VWF:AG Gehalts beträgt 333,9 mU/ml bei 129/Sv Mäusen und 319,8 mU/ml bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen und unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. t-Test: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind alle Werte inklusive der Mittelwerte  $\pm$  SEM als Dot-Plot.

Um eine Ausschüttung des VWFs aus den Speichergranula zu bewirken, wurden beide Versuchsgruppen zunächst mit 200  $\mu$ l einer 0,1 M Histaminlösung i.p. behandelt und der Anstieg des VWF:AG Gehalts im Blut der Mäuse 2 h nach Behandlung überprüft. Die Histamin Behandlung führte zu einer Erhöhung des VWF Spiegels im Blut der Wildtyp Mäuse auf einen Mittelwert von  $447,3 \pm 35,53$  mU/ml. Der Mittelwert des VWF:AG Gehalts der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse betrug nach Histamin Behandlung  $509,2 \pm 13,50$  mU/ml (Abbildung 37).

Eine Behandlung der Mäuse mit 400  $\mu$ l 0,1 M Histamin erhöhte den VWF:AG Gehalt bei Wildtyp Mäusen auf  $472,0 \pm 72,83$  mU/ml und bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auf  $545,3 \pm 17,58$  mU/ml. Es konnte kein signifikanter Unterschied der beiden Histamindosierungen auf den Anstieg des VWF:AG Spiegels nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen wurde daher mit einer Dosierung von 200  $\mu$ l 0,1 M Histaminlösung gearbeitet (Abbildung 37).

## Ergebnisse

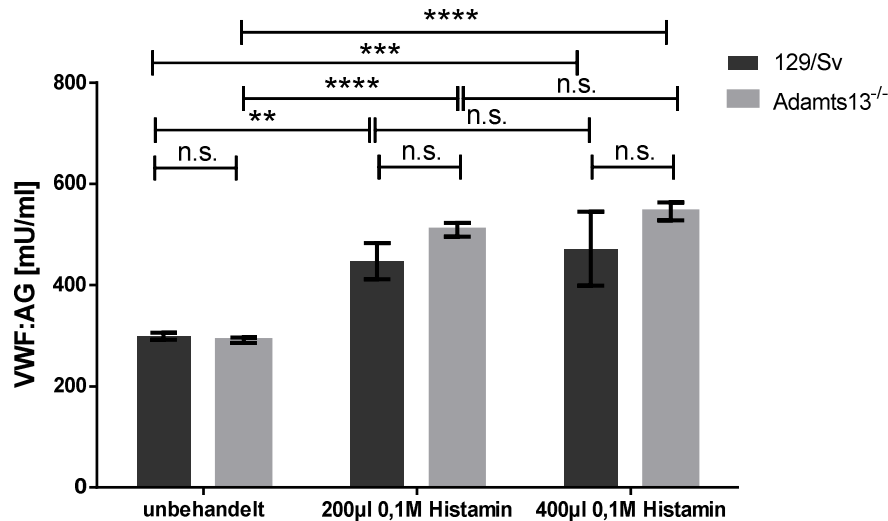


Abbildung 37: Einfluss der Histamininjektion auf den VWF:AG Gehalt im Blut der 129/Sv Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Mäuse wurden mit 200 bzw. 400 µl 0,1 M Histamin i.p. behandelt. Der VWF:AG Gehalt wurde vor Behandlung und zwei Stunden nach Behandlung mit Histamin im Blut der Mäuse gemessen. Der Mittelwert des VWF:AG Gehalts der Wildtyp Mäuse betrug 298,8 ± 6,7 mU/ml (n=6) vor Behandlung und 447,3 ± 35,5 mU/ml (n=4) nach Injektion von 200µl Histamin bzw. 472,0 ± 72,8 mU/ml (n=3) nach Injektion von 400 µl Histamin. Der Mittelwert des VWF:AG Gehalts der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse betrug 291,0 ± 5,5 mU/ml (n=8) vor Behandlung und 509,2 ± 13,5 mU/ml (n=4) nach Injektion von 200µl Histamin bzw. 545,3 ± 17,6 mU/ml (n=4) nach Injektion von 400 µl Histamin. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Zusätzlich zur Untersuchung des VWF:AG Gehalts wurde auch das Multimermuster des VWFs nach Histaminbehandlung zwischen Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen.

Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten deutlich ultralange Multimere, die bei Wildtyp Mäusen nur andeutungsweise zu erkennen waren. Die Tripletstruktur ist bei den Wildtyp Mäusen gut zu erkennen, im Plasma der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen nur sehr schwach ausgebildet (Abbildung 38). Das Multimermuster der mit Histamin behandelten Mäuse unterschied sich somit nicht im Vergleich zum Multimermuster unbehandelter Mäuse.

## Ergebnisse

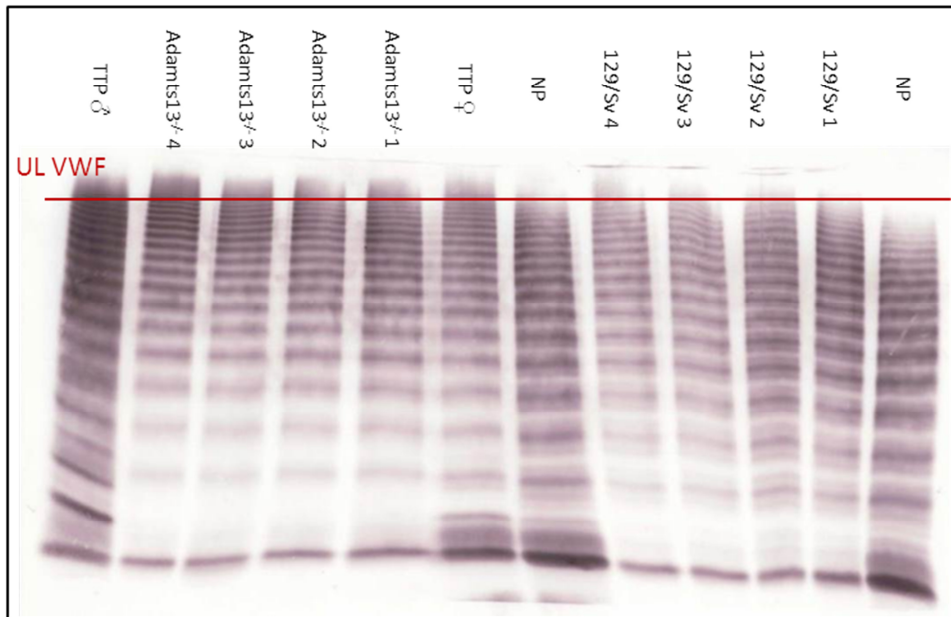


Abbildung 38: VWF Multimermuster von Adams13<sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäusen nach Histamin Behandlung in einem 1% Agarosegel im Vergleich zu Normalpoolplasma (NP) und Plasma eines TTP-Patienten (TTP). Die rote Linie markiert die Grenze zwischen großen und ultralangen (UL) VWF Multimeren, die im Plasma der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse und des TTP Patienten deutlich zu erkennen waren. Im NP fehlten UL VWF Multimere, im Plasma der Wildtyp Mäuse waren sie nur andeutungsweise zu erkennen.

Obwohl die Histamin Behandlung den endogenen VWF:AG Gehalt der Mäuse um mehr als 50% im Vergleich zum Ausgangswert erhöhte, konnten weder bei den Wildtyp noch bei den Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen Veränderungen der Thrombozytenzahlen durch die Histamin Behandlung beobachtet werden. Der Mittelwert der Thrombozytenzahlen betrug nach Histamin Behandlung bei den Wildtyp Mäusen  $863,4 \pm 53,71^* 10^3/\mu\text{l}$  (n=7) und hat sich somit nicht signifikant vom Ausgangswert von  $776,9 \pm 33,74^* 10^3/\mu\text{l}$  (n=9) verändert. Die Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse hatten einen Ausgangswert der Thrombozytenzahlen von  $754,7 \pm 31,48^* 10^3/\mu\text{l}$  (n=11), die sich nach Behandlung auf  $781,3 \pm 94,98^* 10^3/\mu\text{l}$  (n=8) minimal erhöhte (Abbildung 39).

## Ergebnisse

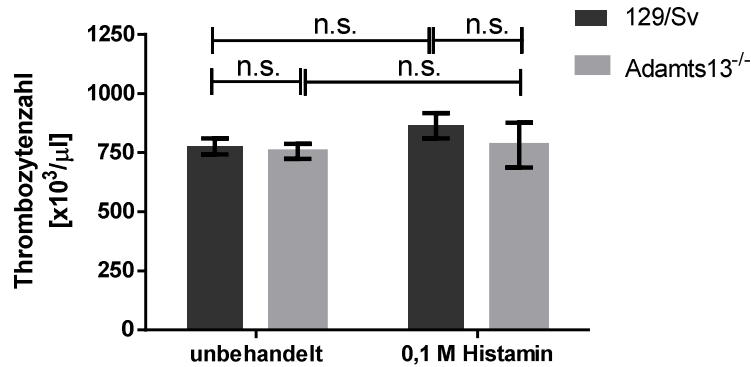


Abbildung 39: Thrombozytenzahlen der 129/Sv Wildtyp ( $n \geq 7$ ) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse ( $n \geq 8$ ). Die Mäuse wurden mit 200  $\mu\text{l}$  0,1 M Histamin i.p. behandelt. Thrombozytenzahlen wurden vor Behandlung und zwei Stunden nach Behandlung mit Histamin im Blut der Mäuse gemessen. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Thrombozytenkonzentrationen gemessen werden. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.7 UNTERSUCHUNG VON HISTONEN ALS TRIGGERFAKTOREN FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN

Fuchs et al. konnten 2011 zeigen, dass Histone in Mäusen eine starke Thrombozytopenie auslösen [148]. Um zu prüfen, ob die Histon-induzierte Thrombozytopenie in Mäusen durch ADAMTS13 beeinflusst wird, wurden Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse intravenös mit Histonen in unterschiedlicher Dosierung behandelt. Eine Konzentration von 50 mg/kg KGW Histone führte zu einem raschen und sehr starken Thrombozytenabfall von  $93,5 \pm 1,2\%$  ( $n=8$ ) bei Wildtyp Mäusen und  $92,5 \pm 1,8\%$  ( $n=8$ ) bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Eine Dosis von 25 mg/kg KGW Histonen zeigte einen konzentrationsabhängigen Thrombozytenabfall von  $54,1 \pm 8,9\%$  ( $n=4$ ) bei Wildtyp Mäusen und  $55,4 \pm 3,5\%$  ( $n=6$ ) bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die niedrigste Dosis von 12,5 mg/kg KGW Histonen bewirkte bei den Wildtyp Mäusen einen stärkeren Thrombozytenabfall von  $19,3 \pm 2,1\%$  ( $n=8$ ). Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse reagierten mit einem geringeren Thrombozytenabfall von lediglich  $13,3 \pm 1,9\%$  ( $n=8$ ) (Abbildung 40).



## Ergebnisse

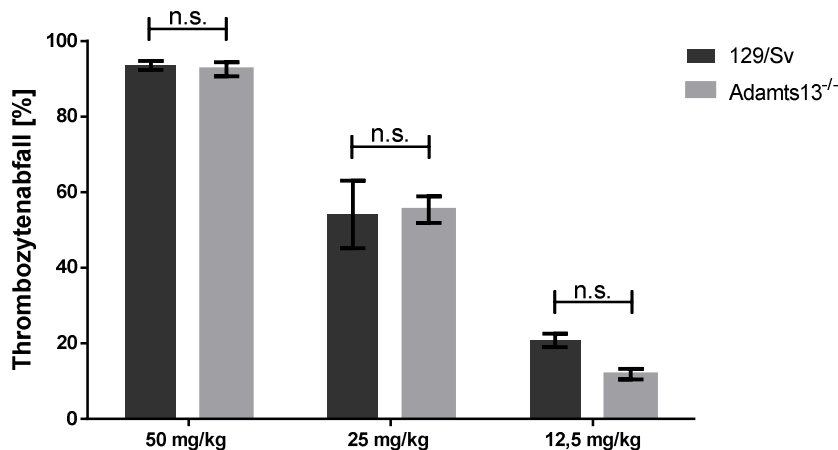


Abbildung 40: Histon-induzierter Thrombozytenabfall bei 129/Sv Wildtyp Mäusen und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Mäuse wurden mit Histonen in unterschiedlicher Konzentration i.v. behandelt. Um den Thrombozytenverbrauch in Prozent zum Ausgangswert zu berechnen, wurde den Mäusen vor und 15 min nach Behandlung Blut entnommen. In hoher Dosierung konnte kein Unterschied im Thrombozytenverbrauch zwischen Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen werden. Bei einer Dosierung von 12,5 mg/kg KGW Histone zeigten die Wildtyp Mäuse (n=8) einen höheren Thrombozytenverbrauch von 19,8%. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=8) zeigten einen Thrombozytenabfall von 13,3%. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Somit konnte gezeigt werden, dass Histone zu einem systemischen Thrombozytenabfall führen, dieser jedoch insbesondere in höherer Dosierung nicht von der ADAMTS13-Aktivität im Plasma abhängig ist.

## 4.8 UNTERSUCHUNG VON CHININ ALS TRIGGERFAKTOR FÜR TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN

### 4.8.1 EINFLUSS DER HOCHDOSIERTEN CHININBEHANDLUNG AUF ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTYPMÄUSE

Um die Rolle von Chinin als Triggerfaktor bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen zu testen, wurden sowohl Wildtyp als auch Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse zunächst einmalig mit einer hohen Dosis Chinin (3mg/Maus) behandelt. Die Mäuse zeigten während des Beobachtungszeitraums von zunächst 2 Wochen geringe Schwankungen der Thrombozytenzahlen zwischen 80 und 125%, die allerdings nicht signifikant vom Ausgangswert abwichen (Abbildung 41). Der Hämoglobingehalt im Blut der Mäuse zeigte ebenfalls geringe Schwankungen, die sich immer zwischen 13 und 16 g/dl bewegten und somit keine signifikanten Veränderungen darstellten (Abbildung 42). Eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere, welches sich unter anderem in einer Abnahme des Körpergewichts der Tiere äußert, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Mäuse hatten zu Beginn des Versuchs ein Körpergewicht von ca. 25 g. Im

## Ergebnisse

Verlauf der 2 Wochen zeigte sich eine physiologische Gewichtszunahme der Tiere auf ca. 26 g (Abbildung 43).

Nachdem innerhalb dieser 2 Wochen somit keine Chinin-bedingten Veränderungen insbesondere der Thrombozytenzahlen zu erkennen waren, wurde eine weitere Chininbehandlung (2 mg/Maus) durchgeführt. Auch diese Behandlung zeigte in den darauffolgenden 6 Tagen keine Effekte bezüglich der Thrombozytenzahlen, die weiterhin zwischen 80 und 120% lagen (Abbildung 41). Die Hämoglobinwerte lagen zwischen 14 und 16 g/dl (Abbildung 42) und das Körpergewicht stieg weiter auf einen Mittelwert von 26,6 g an (Abbildung 43). Im Blutausstrich traten weder zu Beginn des Versuchs noch nach 15 Tagen Fragmentozyten auf (Abbildung 44). Nach 3 Wochen wurde der Versuch beendet.

Eine hochdosierte Chininbehandlung der *Adams13<sup>-/-</sup>* Mäuse hatte somit keinen Effekt auf Thrombozytenzahlen, Hämoglobin und Körpergewicht im Vergleich zu 129/Sv Mäusen.

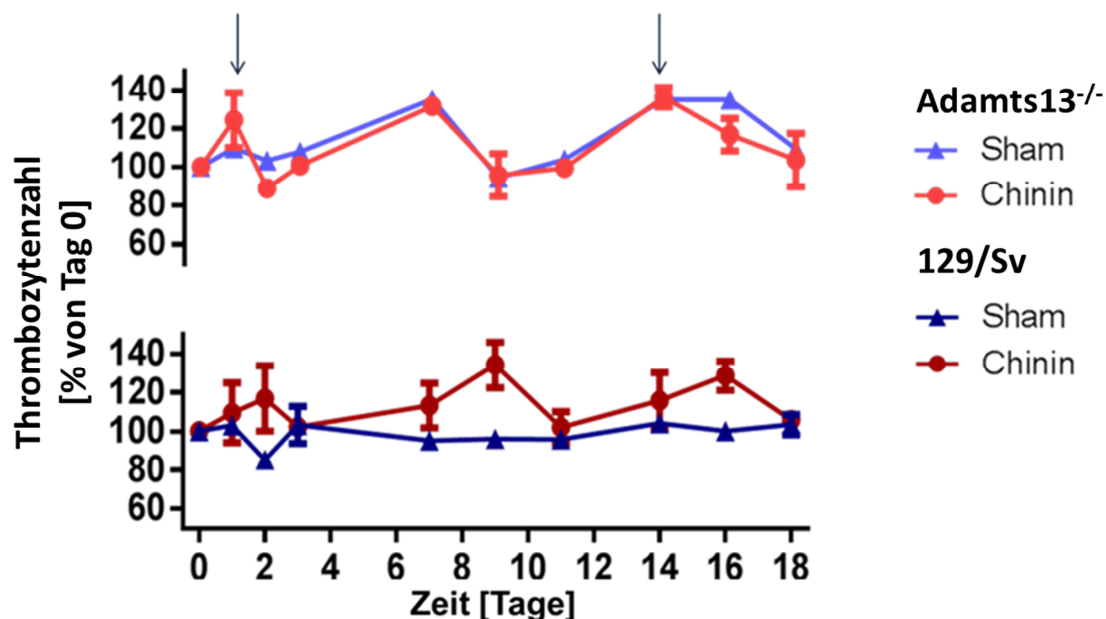


Abbildung 41: Verlauf der Thrombozytenzahlen der *Adams13<sup>-/-</sup>* ( $n \geq 4$ , obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse ( $n \geq 4$ , untere beiden Kurven) über einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin. Die erste Messung erfolgte vor Beginn der Chininbehandlung (Tag 0). Der linke Pfeil markiert die erste Chininbehandlung an Tag 1  $\downarrow$  (3 mg/Maus). Der rechte Pfeil markiert die zweite Chininbehandlung an Tag 14  $\downarrow$  (2 mg/Maus). Die roten Linien geben die Veränderungen der Thrombozytenzahlen der Chinin-behandelten Mäuse (Chinin) wieder. Die blauen Linien geben die Veränderungen der Thrombozytenzahlen der mit Wasser behandelten Mäuse (Sham) wieder. In allen vier Versuchsgruppen waren geringe Schwankungen der Thrombozytenzahlen messbar, die sich jedoch nicht außerhalb des Referenzbereichs bewegten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ergebnisse

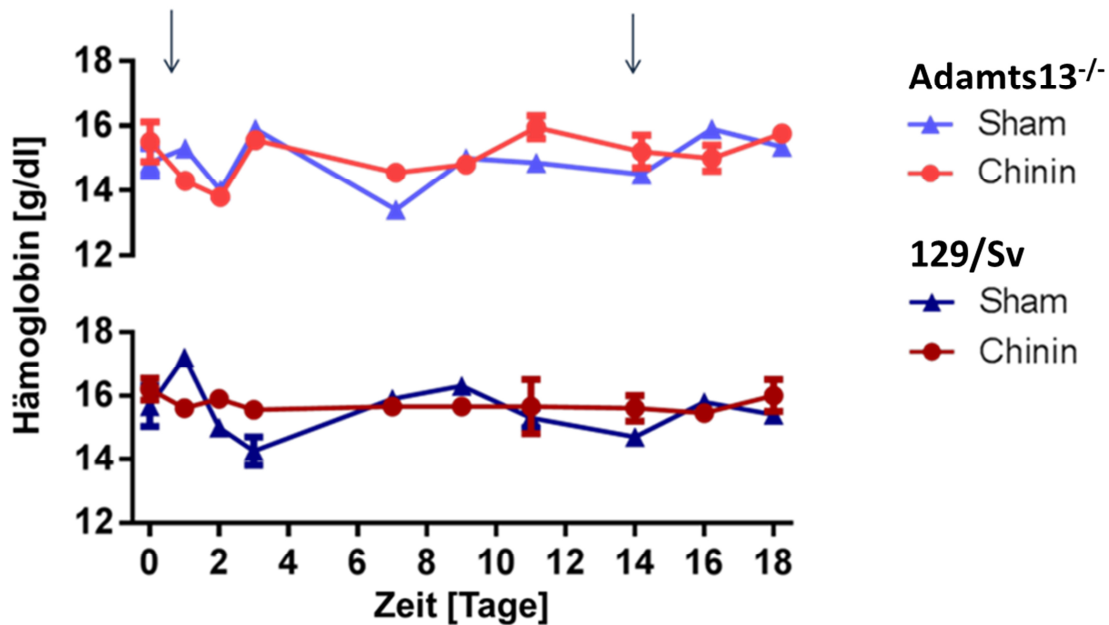


Abbildung 42: Verlauf der Hämoglobin-Konzentrationen der Adamts13<sup>-/-</sup> (n≥4, obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse (n≥4, untere beiden Kurven) über einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin. Die erste Messung erfolgte vor Beginn der Chininbehandlung (Tag 0). Der linke Pfeil markiert die erste Chininbehandlung an Tag 1 ↓(3 mg/Maus). Der rechte Pfeil markiert die zweite Chininbehandlung an Tag 14 ↓(2 mg/Maus). Die roten Linien geben die Veränderungen der Hämoglobin-Konzentrationen der Chinin-behandelten Mäuse (Chinin) wieder. Die blauen Linien geben die Veränderungen der Hämoglobin-Konzentrationen der mit Wasser behandelten Mäuse (Sham) wieder. In allen vier Versuchsgruppen konnten keine auffälligen Veränderungen der Hämoglobin-Konzentration infolge der Chininbehandlung festgestellt werden. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

## Ergebnisse

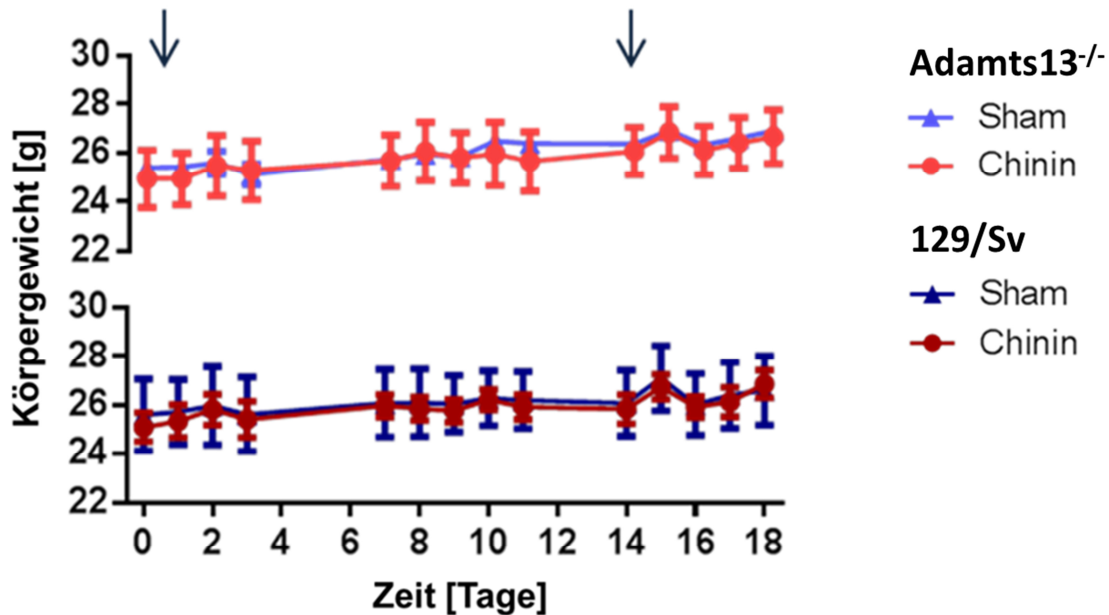


Abbildung 43: Verlauf des Körpergewichts der Adamts13<sup>-/-</sup> (n≥4, obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse (n≥4, untere beiden Kurven) über einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin. Die erste Messung erfolgte vor Beginn der Chininbehandlung (Tag 0). Der linke Pfeil markiert die erste Chininbehandlung an Tag 1 ↓(3 mg/Maus). Der rechte Pfeil markiert die zweite Chininbehandlung an Tag 14 ↓(2 mg/Maus). Die roten Linien geben die Veränderung des Körpergewichts der Chinin-behandelten Mäuse (Chinin) wieder. Die blauen Linien geben die Veränderung des Körpergewichts der mit Wasser behandelten Mäuse (Sham) wieder. Alle 4 Versuchsgruppen zeigten eine physiologische Zunahme des Körpergewichts um ca. 1 g. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

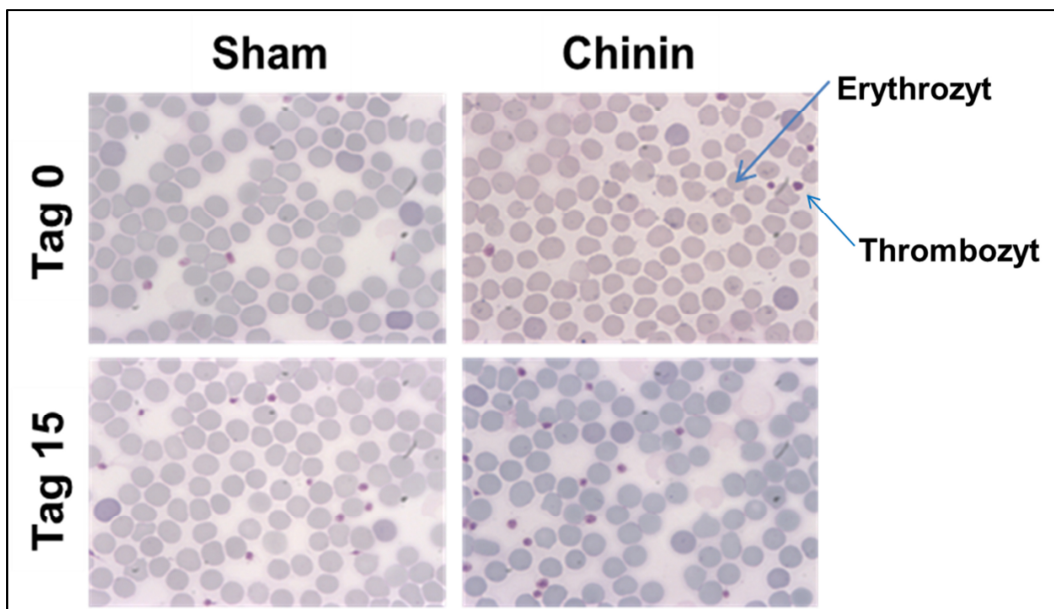


Abbildung 44: Repräsentative Blutausstriche einer unbehandelten (Sham) und einer Chinin-behandelten Adamts13<sup>-/-</sup> Maus von Tag 0 (vor Behandlung) und Tag 15 nach Behandlung. Pappenheimfärbung, 1000-fache Vergrößerung. Es konnten weder bei den mit Chinin noch bei den Sham-behandelten Mäusen Fragmentozyten im Blutausstrich nachgewiesen werden.

### **4.8.2 EINFLUSS DER NIEDRIGDOSIERTEN, KONTINUIERLICHEN CHININBEHANDLUNG AUF ADAMTS13<sup>-/-</sup> - UND WILDTPYMÄUSE**

In diesem weiteren Modell der Chininbehandlung wurde getestet, ob durch eine kontinuierliche niedrigdosierte Chinineinnahme eine eventuelle Sensibilisierung der Mäuse stattfindet, die dann zur Entwicklung TTP-typischer Symptome führt.

Die kontinuierliche Chininbehandlung über das Trinkwasser in einer Dosierung von 30 µg/ml zeigte sowohl bei Wildtyp als auch Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen keine Gewichtsabnahme, keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und keine Veränderung des Verhaltens der Tiere. Das Körpergewicht stieg innerhalb des gesamten Behandlungszeitraums kontinuierlich von 20 g auf 23 g an (Abbildung 47). Nach zwei Wochen wurde den Mäusen Blut entnommen und dieses auf TTP-typische Symptome hin untersucht. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Thrombozytenzahlen und des Hämoglobingehalts innerhalb der Versuchsgruppen festgestellt werden. Zu Beginn des Versuchs hatten sowohl die Chinin-behandelten und unbehandelten Wildtyp als auch Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse Thrombozytenzahlen zwischen 600 und 700 x 10<sup>3</sup>/µl. Nach 14-tägiger Chininbehandlung stiegen die Thrombozytenzahlen bei allen vier Versuchsgruppen geringgradig auf 670 bis 760 x 10<sup>3</sup>/µl an. Nach weiteren 7 Tagen lagen die Thrombozytenzahlen zwischen 790 und 850 x 10<sup>3</sup>/µl (Abbildung 45). Zu diesem Zeitpunkt (Tag 21 nach Beginn des Versuchs) wurde die Chinin-Behandlung abgesetzt. Nach weiteren 14 Tagen ohne Chinin, wurde eine evtl. Auftretende Sensibilisierung gegenüber Chinin getestet. Vier Tage vor erneuter hochdosierter Chinineingabe (Tag 31 nach Beginn des Versuchs) war das Blutbild der Mäuse noch immer unauffällig. Auch an Tag 36, nach Verabreichung der hochdosierten Chininlösung (2 mg/Maus) als Bolus per Schlundsonde, konnte keine negative Beeinflussung der Blutwerte und des Verhaltens der Mäuse durch die Chininbehandlung beobachtet werden. Die Thrombozytenzahlen stiegen in allen 4 Versuchsgruppen weiter auf 800 bis 900 x 10<sup>3</sup>/µl an (Abbildung 45). Der Hämoglobingehalt blieb über den gesamten Versuchsverlauf konstant bei 15 bis 16 g/dl (Abbildung 46). Fragmentozyten konnten bei keiner der Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Abbildung 48).

Eine niedrigdosierte, kontinuierliche Chininbehandlung der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hatte somit keinen Effekt auf Thrombozytenzahlen, Hämoglobin und Körpergewicht im Vergleich zu 129/Sv Mäusen.

## Ergebnisse

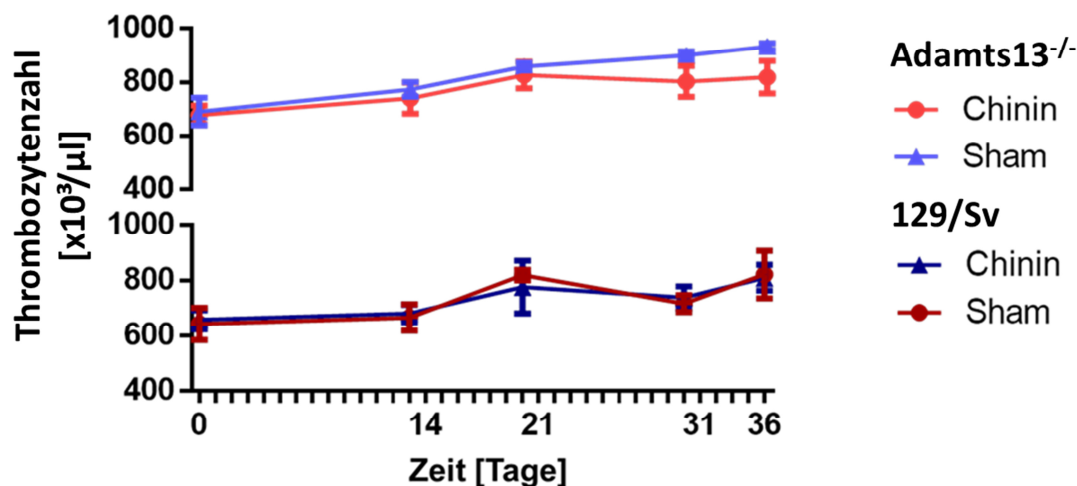


Abbildung 45: Verlauf der Thrombozytenzahlen während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse. Die 129/Sv Mäuse (n=3) hatten zu Beginn des Versuchs (Tag 1) eine durchschnittliche Thrombozytenzahl von  $650 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 40 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n≥3) hatten eine durchschnittliche Thrombozytenzahl von  $684 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 66 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Die Thrombozytenzahlen stiegen bei allen 4 Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum langsam geringgradig an, sodass die durchschnittliche Thrombozytenzahl nach 36 Tagen bei den 129/Sv Mäusen bei  $815 \pm 57 \times 10^3/\mu\text{l}$  lag. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hatten nach 26 Tagen eine durchschnittliche Thrombozytenzahl von  $868 \pm 99 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Chinin-behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen festgestellt werden. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

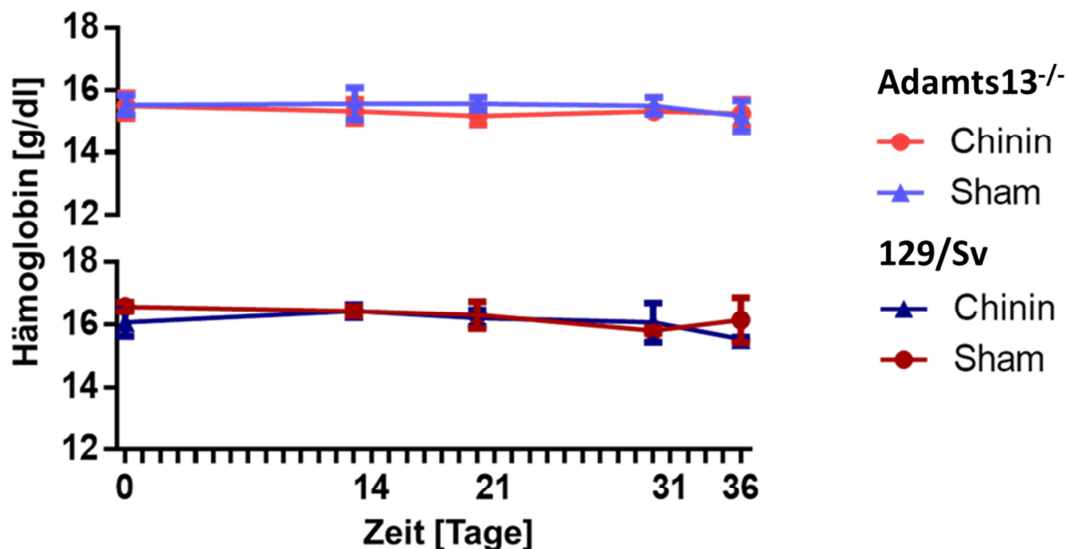


Abbildung 46: Verlauf des Hämoglobingehalts während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv (n=3) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n≥3). Der Hämoglobingehalt blieb über den gesamten Versuchszeitraum bei allen vier Versuchsgruppen konstant zwischen 15 und 17 g/dl. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ergebnisse

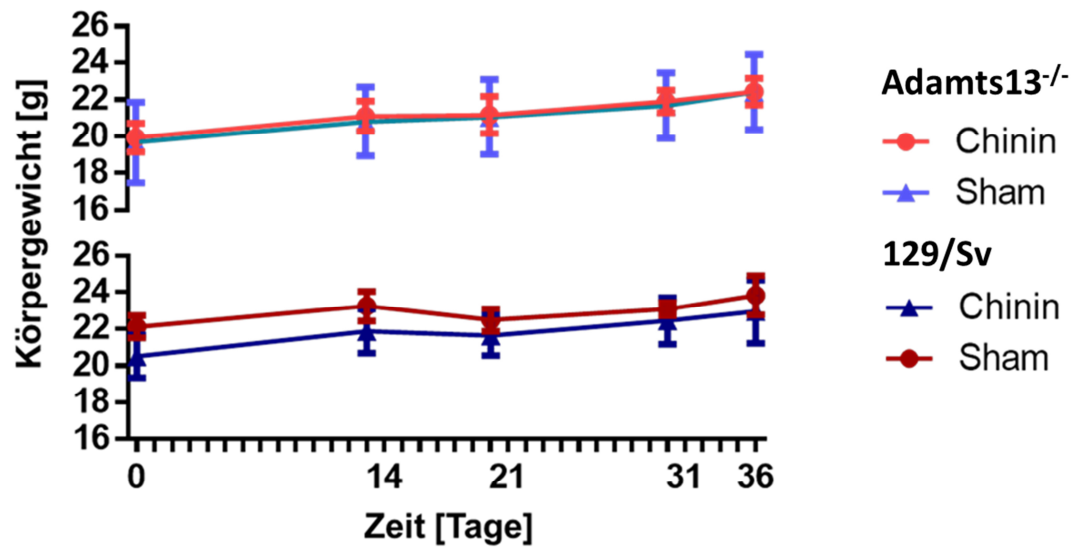


Abbildung 47: Verlauf des Körpergewichts während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv (n=3) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n≥3). Die Mäuse zeigten eine langsame Gewichtszunahme von zu Beginn (Tag 1) durchschnittlich 21g bei den Wildtyp Mäusen und 20 g bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auf 23,4 g bzw. 22,4 g innerhalb des Beobachtungszeitraums. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

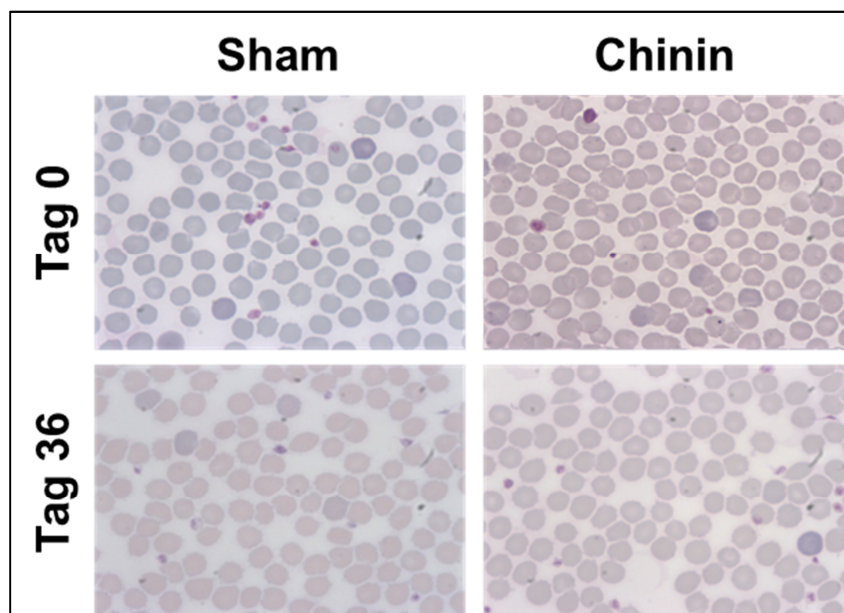


Abbildung 48: Repräsentative Blutausstriche einer unbehandelten (Sham) und einer Chinin-behandelten Adamts13<sup>-/-</sup> Maus von Tag 0 (vor Behandlung) und Tag 36 nach Behandlung. Pappenheimfärbung, 1000-fache Vergrößerung. Es konnten weder bei den mit Chinin noch bei den unbehandelten (Sham) Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen nach 36 Tagen Fragmentozyten im Blutausstrich nachgewiesen werden.



#### **4.9 UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON INFEKTIONEN ALS POTENTIELLE TRIGGERFAKTOREN FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Häufige Auslöser akuter TTP-Schübe beim Menschen sind Infektionen. Hierbei spielen vor allem Infektionen des gastrointestinal Traktes und der Atemwege eine wichtige Rolle [4, 41, 149]. Daher wurde die Auswirkung zwei verschiedener Lungeninfektionsmodelle an Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen untersucht.

##### **4.9.1 UNTERSUCHUNG DER LPS-INDUZIERTEN AKUTEN LUNGENSCHÄDIGUNG ALS TRIGGERFAKTOR FÜR TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Die Thrombozytenzahl diente hierbei als Anhaltspunkt für die Auslösung TTP-typischer Symptome. Die Leukozytenzahl sollte als Anhaltspunkt für die Funktion der angeborenen Immunität der Mäuse mit untersucht werden.

Die intratracheale Injektion von LPS löste sowohl in den Adamts13<sup>-/-</sup> als auch in den Wildtyp Mäusen keinen Thrombozytenabfall aus. Die Thrombozytenzahlen der behandelten Mäuse blieben konstant zwischen 600 und 800 x 10<sup>3</sup>/μl, wobei die unbehandelten Mäuse einen geringgradigen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl von durchschnittlich 700 auf 800 x 10<sup>3</sup>/μl zeigten (Abbildung 49).



## Ergebnisse

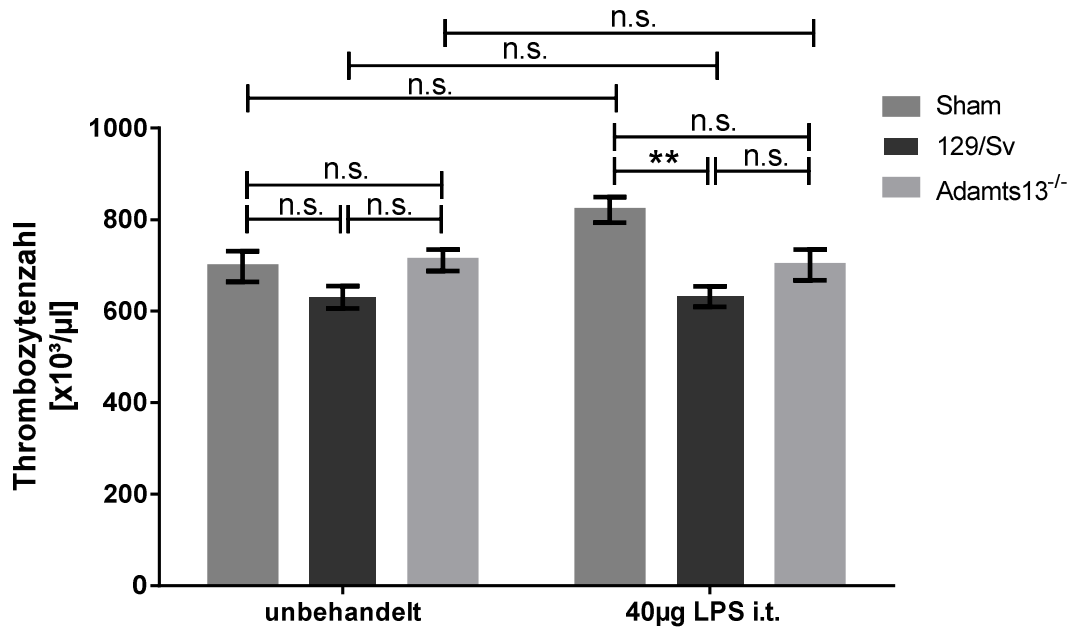


Abbildung 49: Thrombozytenzahlen der 129/Sv (n=12) und Adamts13<sup>-/-</sup> (n=11) Mäuse vor Auslösung einer akuten Lungenschädigung mittels LPS und 8h nach LPS-Behandlung. Die Sham- Gruppe (n=5) wurde mit reiner PBS Lösung behandelt. Die Behandlung mit LPS bewirkte keine Veränderung der Thrombozytenzahlen in 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Thrombozytenzahlen der unbehandelten Mäuse stiegen dagegen leicht an. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*\*p<0,01, n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Die Leukozytenzahlen im Blut der Mäuse fielen in Folge der LPS-Behandlung von zu Beginn durchschnittlich  $8,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  bei den Wildtyp Mäusen auf  $5,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  8h nach LPS Injektion. Die Sham-Gruppe zeigte einen minimalen, nicht signifikanten Abfall der Leukozytenzahlen von  $8,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $6,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Den stärksten Leukozytenabfall entwickelten die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse von  $6,9 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $3,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Abbildung 50).

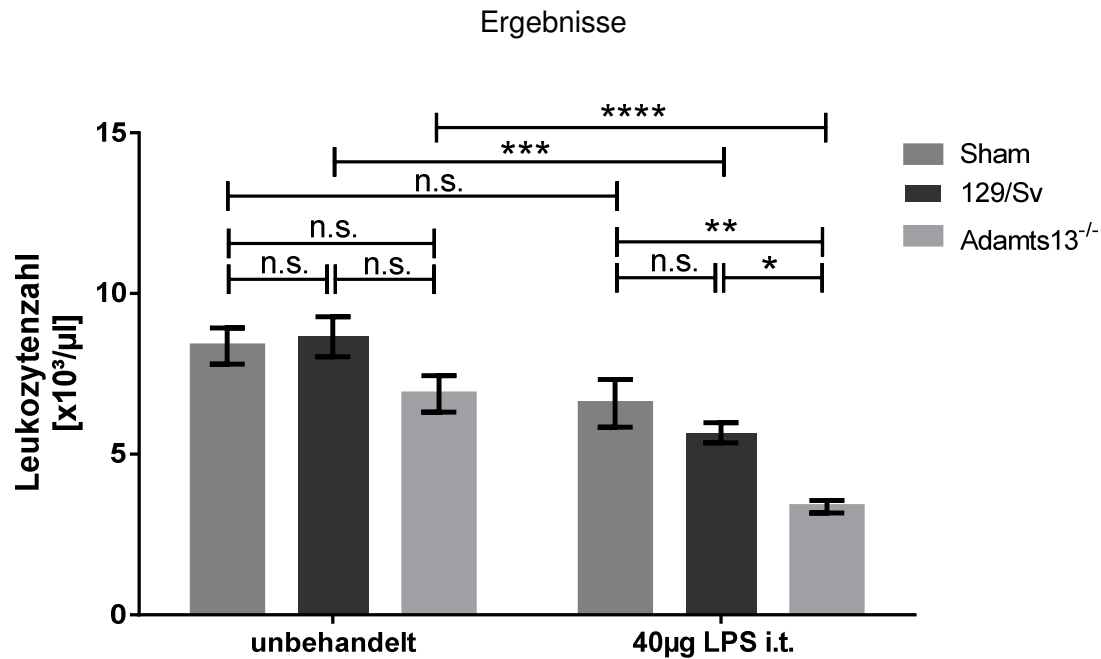


Abbildung 50: Veränderung der Leukozytenzahlen infolge der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung bei 129/Sv (n=11) und Adamts13<sup>-/-</sup> (n=12) Mäusen. Die Sham-Gruppe (n=5) wurde mit reiner PBS Lösung behandelt. Alle drei Versuchsgruppen zeigten einen Abfall der Leukozytenzahlen im Blut, wobei dieser bei der Sham-Gruppe minimal und nicht signifikant war. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten den stärksten Abfall der Leukozytenzahl von 6,9 x 10<sup>3</sup>/µl auf 3,4 x 10<sup>3</sup>/µl. Varianzanalyse plus Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, n.s.=nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Somit konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte akute Lungenschädigung keine TTP-typischen Symptome in Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen auslöste, die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch mit einem stärkeren Leukozyten Abfall reagierten.

#### 4.9.2 UNTERSUCHUNG DER *ASPERGILLUS FUMIGATUS*-INDUZIERTEN PNEUMONIE ALS TRIGGERFAKTOR FÜR DIE TTP IN ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN

In diesem Entzündungsmodell konnte ein geringgradiger, jedoch nicht signifikanter Abfall der Thrombozytenzahlen von 733,7 auf 641,3 x10<sup>3</sup>/µl bei 129/Sv Mäusen beobachtet werden. Die Thrombozytenzahlen der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse veränderten sich minimal von 746,7 auf 731,1 x 10<sup>3</sup>/µl infolge der *Aspergillus fumigatus* Infektion. Die Thrombozytenzahlen beider Versuchsgruppen veränderten sich lediglich innerhalb des Referenzbereichs. Somit konnte weder bei den Wildtyp noch bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen ein TTP-typischer starker Thrombozytenabfall nachgewiesen werden (Abbildung 51).

## Ergebnisse

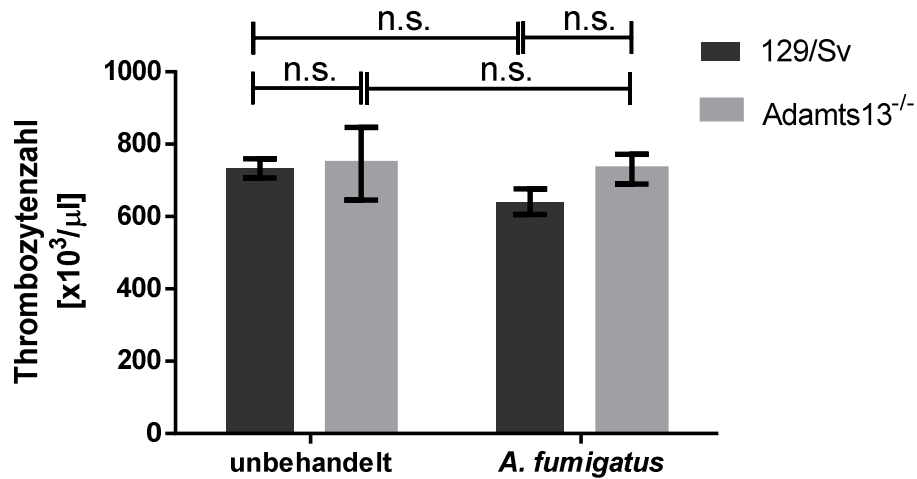


Abbildung 51: Thrombozytenzahlen im Blut der unbehandelten und *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (100 µl einer 10<sup>7</sup> Konidien/ml Aspergilluslösung) behandelten 129/Sv (n=7) und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=7) 24 h nach Infektion. Weder die Adamts13<sup>-/-</sup> noch die 129/Sv Mäuse entwickelten einen TTP-typischen Thrombozytenabfall nach Infektion mit *A. fumigatus*. t-Test: n.s.=nicht signifikant. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

Sowohl die 129/Sv als auch die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse reagierten auf die Aspergillose-Behandlung mit einem Abfall der Leukozytenzahlen im Blut. Die Leukozytenzahlen betrugen vor der Pilzinfektion bei den Wildtyp Mäusen 8,6 x 10<sup>3</sup>/µl und bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen 6,8 x 10<sup>3</sup>/µl. 24h nach der Pilzinfektion sanken die Leukozytenzahlen bei den Wildtypmäusen auf 4,6 x 10<sup>3</sup>/µl und bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auf 3,6 x 10<sup>3</sup>/µl (Abbildung 52).

## Ergebnisse

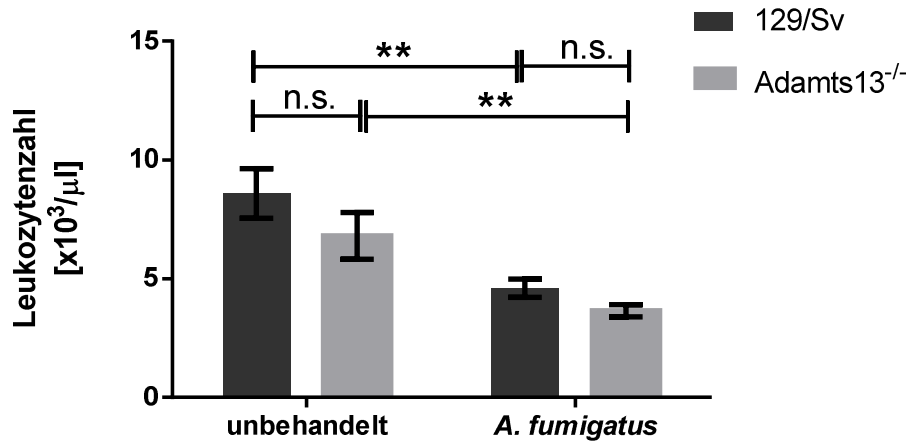


Abbildung 52: Veränderung der Leukozytenzahlen im Blut infolge der *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) induzierten akuten Lungenentzündung bei 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die 129/Sv Mäuse hatten schon vor der Behandlung mit *A. fumigatus* eine höhere Leukozytenzahl von  $8,6 \pm 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  (n=3) als die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $6,8 \pm 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  (n=3). Beide Versuchsgruppen zeigten 24 h nach Infektion einen signifikanten Abfall der Leukozytenzahlen im Blut auf  $4,6 \pm 0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  bei den 129/Sv Mäusen (n=7) und  $3,6 \pm 0,3 \times 10^3/\mu\text{l}$  bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen (n=7). t-Test: \*\* p<0,01, n.s.=nicht signifikant. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In der durchflusszytometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der Granulozyten (Gr-1 positive und CD11b hochregulierte Zellen im Blut) an der Gesamtzahl der Leukozyten im Blut der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den 129/Sv Mäusen signifikant erniedrigt war (Abbildung 53). Der prozentuale Anteil der Granulozyten im Blut der *Aspergillus fumigatus* infizierten Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse entsprach mit 15,5% ungefähr dem der Kontrolltiere (17,1%), die nur mit Wasser behandelt wurden. Die 129/Sv Mäuse reagierten dagegen mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Blut auf fast 30% ( $29.31 \pm 2.30\%$ ).

## Ergebnisse

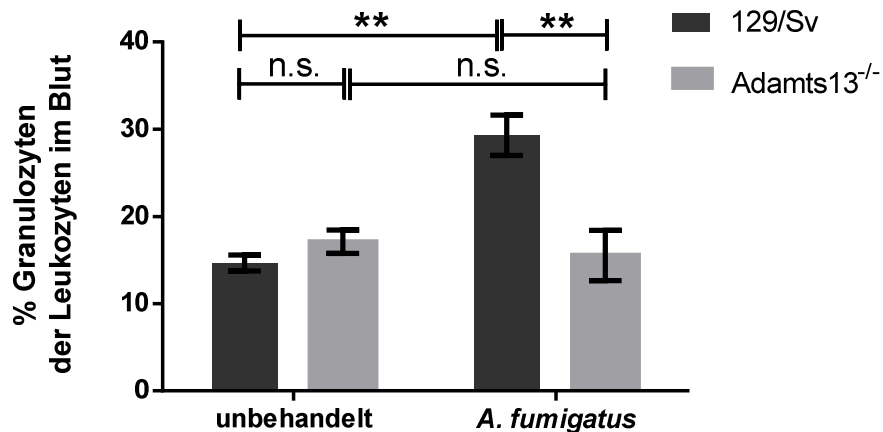


Abbildung 53: Prozentualer Anteil der Granulozyten (anti-Gr-1 positive Zellen) an der Gesamtzahl der Leukozyten im Blut unbehandelter ( $n=3$ ) und *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) infizierter ( $n \geq 7$ ) 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse 24 h nach Infektion. Der Anteil an Granulozyten lag bei den unbehandelten Mäusen bei ca. 15% und unterschied sich nicht signifikant zwischen Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die *A. fumigatus* Infektion führte bei den 129/Sv Mäusen zu einem starken Anstieg der Granulozyten auf fast 30%, wohingegen der Anteil der Granulozyten bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen bei durchschnittlich 15% blieb. Die durchflusszytometrische Messung der Granulozyten wurde von der Arbeitsgruppe Radsak (Universitätsmedizin Mainz, Institut für Immunologie) durchgeführt. t-Test: \*\* $p < 0,01$ , n.s.=nicht signifikant. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Gesamtzahl der Granulozyten in der BALF der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse war 24 h nach der *Aspergillus fumigatus* Infektion mit nur  $5,5 \times 10^3$  ebenfalls wesentlich geringer als bei den 129/Sv Mäusen. Diese wiesen zu diesem Zeitpunkt eine Gesamtzahl an Granulozyten von durchschnittlich  $26,1 \times 10^3$  in der BALF auf (Abbildung 54).

## Ergebnisse

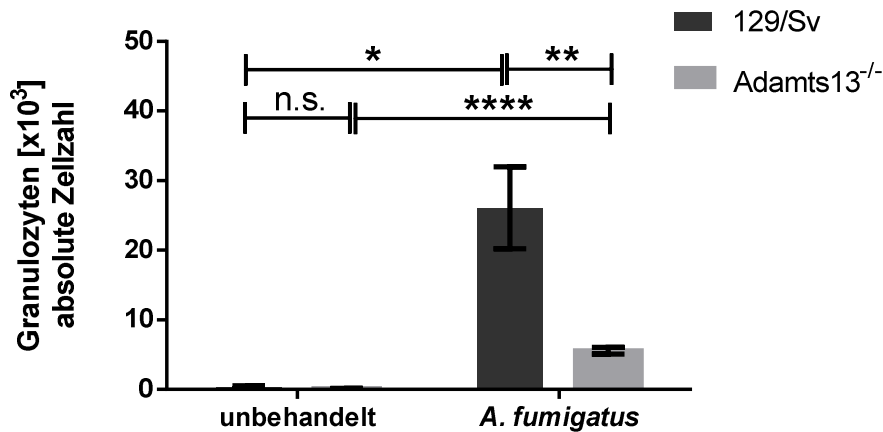


Abbildung 54: Anzahl der Granulozyten (absolute Zellzahl) in der Bronchoalveolarlavage Flüssigkeit (BALF) unbehandelter (n=3) und *Aspergillus fumigatus* infizierter (n≥7) 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse 24h nach Infektion. In der BALF der unbehandelten Mäuse konnte nur eine minimale Anzahl an Granulozyten nachgewiesen werden. *A. fumigatus* infizierte 129/Sv Mäuse hatten mit 26,1% erheblich mehr Granulozyten als Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit nur 5,5 %. Die durchflusszytometrische Messung der Granulozyten in der BALF wurde von der Arbeitsgruppe Radsak (Universitätsmedizin Mainz, Institut für Immunologie) durchgeführt. t-Test: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001, n.s.=nicht signifikant. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

Um die Folgen der verminderten Anzahl an Leukozyten im Blut als auch in der BALF der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse zu untersuchen, wurden sowohl Adamts13<sup>-/-</sup> als auch 129/Sv Mäuse über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Auslösung der *Aspergillus fumigatus* induzierten Pneumonie beobachtet und eine Überlebenskurve erstellt (Abbildung 55). 37,5% der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse starben 2 bis 3 Tage nach Infektion. Von den 129/Sv Mäusen überlebten alle Mäuse die Pilzinfektion.

## Ergebnisse

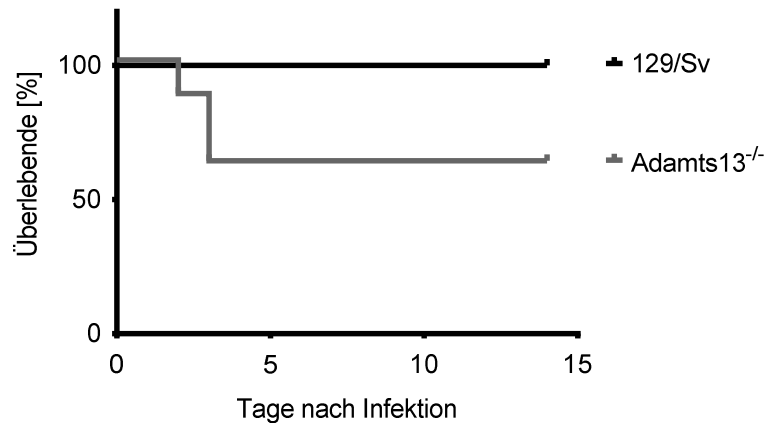


Abbildung 55: Überlebenskurve der Adamts13<sup>-/-</sup> (n=6) und 129/Sv (n=8) Mäuse nach Infektion mit *Aspergillus fumigatus*. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Alle 129/Sv Mäuse überlebten die Infektion, wohingegen 3 der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse 2 bzw. 3 Tage nach Infektion starben. Die Beobachtung der Mäuse und Erstellung der Überlebenskurve wurde von der Arbeitsgruppe Radsak (Universitätsmedizin Mainz, Institut für Immunologie) durchgeführt.

Des Weiteren wurden 24 h nach der *A. fumigatus* Infektion Lungenhomogenate von 129/Sv und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen erstellt und diese auf Sabouraud-4%-Dextroseagarplatten ausgestrichen, um die Pilzbelastung in der Lunge zu quantifizieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $13,81 \pm 1,03 \times 10^5$  CFUs (engl. Colony forming units) eine fast doppelt so hohe Pilzbelastung aufwiesen als die 129/Sv Mäuse mit  $8,86 \pm 1,54 \times 10^5$  CFUs (Abbildung 56).

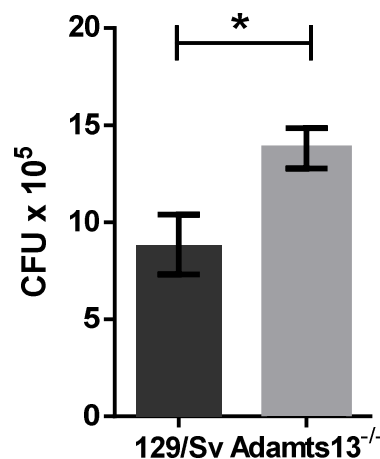


Abbildung 56: Colony forming units (CFU) aus Lungenhomogenaten der Adamts13<sup>-/-</sup> und 129/Sv Mäuse 24 h nach *Aspergillus fumigatus* Infektion. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse (n=16) hatten eine fast doppelt so hohe Pilzbelastung im Vergleich zu 129/Sv Mäusen (n=14) in der Lunge. Die Ausstreichung der Lungenhomogenate und Quantifizierung der CFUs wurde von der Arbeitsgruppe Radsak (Universitätsmedizin Mainz, Institut für Immunologie) durchgeführt. t-Test: \*p<0,05. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ergebnisse

Auch in diesem Modell der invasiven Aspergillose konnte kein TTP-typischer Thrombozytenabfall bei den *Adamts13<sup>-/-</sup>* Mäusen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich, dass die *Adamts13<sup>-/-</sup>* Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Kontrolltieren mit einer geringeren Rekrutierung an Leukozyten, insbesondere Granulozyten, auf das Entzündungsmodell reagierten, was mit einer erhöhten Mortalität und einer stärkeren Ausbreitung der Pilze in der Lunge einherging.



## 5 DISKUSSION

### 5.1 ETABLIERUNG EINES MAUSMODELLS ZUR UNTERSUCHUNG VON TRIGGERFAKTOREN DER ANGEBORENEN TTP

Ein Mangel bzw. ein vollständiges Fehlen der ADAMTS13 Aktivität ist eines der Hauptursachen für die Entstehung der TTP, dennoch ist es nicht alleine ausschlaggebend für die Entwicklung eines akuten TTP Schubes. Mittlerweile sind viele Patienten beschrieben, die zwar dauerhaft einen starken Mangel an ADAMTS13 haben, Krankheitsschübe einer TTP traten dagegen nur nach Kontakt mit einem zusätzlichen Triggerfaktor für TTP auf. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit den Beobachtungen von Banno et al. und Motto et al., die Adamts13-defiziente Mäuse züchteten [1, 2].

Die Arbeitsgruppe von Banno et al.[2] züchtete Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse auf einem 129/Sv Hintergrund und veröffentlichte 2006 die ersten Ergebnisse zur Charakterisierung dieser Mäuse.

Diese Mäuse wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Adamts13 Defizienz wurde durch den Ersatz eines Abschnitts der Exone 3-6 des Adamts13 Gens mit einer Neomycin-Resistenz-Kassette induziert. Dies ist auf DNA Ebene mittels Genotypisierungs-PCR nachweisbar, was in der entsprechenden Veröffentlichung gezeigt wurde und auch in dieser Arbeit (siehe Abbildung 5) bestätigt werden konnte.

Um sicher zu gehen, dass der Knockout auch auf RNA Ebene vorliegt, wurde zusätzlich eine qRT-PCR durchgeführt. Da die Sternzellen der Leber als Hauptexpressionsort für Adamts13 bekannt sind [20, 21], wurde hierfür zunächst Lebergewebe ausgewählt. Mittlerweile sind aber auch weitere Expressionsorte für Adamts13 bekannt, unter anderem Thrombozyten und Endothelzellen [22, 23], sodass die qRT-PCR zusätzlich mit Knochenmark der Mäuse durchgeführt wurde. In beiden Gewebeproben von Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen konnten keine Fluoreszenzsignale für Adamts13 RNA gemessen werden (siehe Abbildung 7 und Abbildung 9). Die als Kontrollen verwendeten Gewebeproben von 129/Sv Wildtyp Mäusen zeigten dagegen einen eindeutigen Fluoreszenzanstieg für Adamts13 RNA. Im Lebergewebe begann dieser Anstieg bereits nach 30 PCR Zyklen, im Knochenmark dagegen erst später nach ca. 40 PCR Zyklen. Dies bestätigt die Leber als Hauptexpressionsort auch bei Mäusen und zeigt gleichzeitig das Vorhandensein von Adamts13-RNA im

## Diskussion

Knochenmark der Wildtyp Mäuse, wenn auch in wesentlich geringeren Konzentrationen.

Ein funktioneller Ausschluss der Adams13 Aktivität erfolgte mittels des quantitativen FRET-S-VWF73 Tests. Dieser zeigte eine mittlere Adams13-Aktivität von  $100 \pm 60$  ng/ml im Plasma der Wildtyp Mäuse. Im Plasma der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse konnte keine Aktivität gemessen werden. Auffällig ist hier, dass die mittlere Adams13 Aktivität der Wildtypmäuse wesentlich geringer ist, als dies im Plasma des Menschen der Fall ist. Beim Mensch beträgt der Referenzbereich der ADAMTS13 Aktivität laut ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity Kit von American Diagnostica  $666 \pm 135$  ng/ml. Die Mäuse zeigten mit durchschnittlich 100 ng/ml nicht einmal ein Sechstel dieser Aktivität. Dies entspräche beim Menschen einer pathologischen Verringerung der ADAMTS13 Aktivität, die unter anderem mit erhöhtem Risiko für frühzeitiges Auftreten von Herzinfarkten und jugendlichen Schlaganfällen einhergehen kann. Dies konnte unter anderem von Lambers et al. [150] gezeigt werden, die die ADAMTS13 Aktivität bei 208 Kindern (0-18 Jahre) mit Schlaganfall untersuchten und eine deutliche Abnahme der Aktivität bei diesen Patienten nachweisen konnten. Kaikita et al. [151] verglichen die ADAMTS13 Aktivität bei Herzinfarktpatienten und Patienten mit stabiler Angina und „Chest Pain Syndrom“ und konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erniedrigter ADAMTS13 Aktivität und dem Risiko und der Schwere eines Herzinfarkts zeigen. Gleichzeitig zeigten sie, dass der VWF:AG Gehalt bei diesen Patienten erhöht war und negativ mit der ADAMTS13 Aktivität korrelierte, was einen Verbrauch der Protease durch die Bildung eines Enzym-Substrat Komplexes mit VWF in den koronaren Thromben vermuten lässt. Die Wildtyp Mäuse mit physiologisch niedriger ADAMTS13 Aktivität als auch die Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse mit kompletter Defizienz der Protease Aktivität zeigten jedoch in unbehandeltem Zustand keinerlei Anzeichen für Herzinfarkte, Schlaganfälle oder ähnliche thrombotische Ereignisse.

Der Vergleich des VWF:AG Gehalts im Blut der Wildtyp Mäuse mit dem der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Sowohl die Adams13<sup>-/-</sup> als auch die 129/Sv Wildtyp Mäuse hatten eine basale VWF:AG Konzentration im Plasma zwischen 300 und 400 mU/ml. Dieses Ergebnis unterscheidet sich allerdings von den Ergebnissen von Banno et al. [2], die von einem erhöhten VWF:AG Gehalt im Blut der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse von 124% im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (100%) berichteten. Dies konnte in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden, was unterschiedliche Ursachen haben kann. VWF reagiert wie ein akute Phase Protein, sodass es zu sehr großen Konzentrationsschwankungen im Blut kommen kann [152, 153]. Die Ausschüttung von VWF aus Megakaryozyten und

## Diskussion

Endothelzellen erfolgt sowohl konstitutiv als auch reguliert durch unterschiedliche Stoffe wie z.B. Histamin, Epinephrin, NO und viele andere Entzündungsmediatoren [60, 137]. Dies führt dazu, dass kleinste Veränderungen in Haltung und Handling der Mäuse mit Schwankungen der VWF Werte einhergehen können. Sowohl ein unterschiedlicher Infektionsdruck als auch Stress vor oder während der Blutabnahme können hier ausschlaggebend sein. Des Weiteren spielt die Art der Blutabnahme ebenfalls eine wichtige Rolle, da die Gerinnung schon während der Blutabnahme einsetzen kann. Dies geht mit einem Verbrauch von VWF einher und würde so zu niedrigeren VWF Werten im Plasma führen. Da in beiden Untersuchungen die gleiche Art der Blutabnahme über den retroorbitalen Plexus am Auge der Mäuse angewandt wurde, konnte dies hier jedoch ausgeschlossen werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Alter der Mäuse. Beim Menschen liegt der Referenzbereich für die VWF Konzentration bei Erwachsenen zwischen 40 bis 160% (0,4 – 1,6 U/ml). Bei Babys und Kleinkindern ist er dagegen wesentlich höher und geht bis zu 260% [154]. Eine Geschlechtsabhängigkeit des VWFs beim Menschen besteht nicht [154]. Bei Mäusen ist hierzu wenig bekannt. Die Mäuse sollten daher für die Untersuchungen sowohl innerhalb der Genotypen als auch in der Vergleichsgruppe alle das gleiche Alter haben. Bei Banno et al. [2] wurden für die phänotypischen Untersuchungen männliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet. In dieser Arbeit wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse im Alter von 8 bis 16 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von  $25 \pm 5$  g verwendet, was die Diskrepanz erklären könnte. Die Angaben des VWF:AG Gehalts in der Veröffentlichung von Banno et al. erfolgt in Prozent bezogen auf den durchschnittlichen VWF:AG Wert der Wildtyp Mäuse, der als 100% gesetzt wurde. Ein direkter Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen ist daher nicht möglich.

Vergleicht man die VWF Konzentration der Mäuse mit der des Menschen ist auch hier auffällig, dass diese bei Mäusen wesentlich niedriger ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse hatten eine durchschnittlichen VWF:AG Konzentration von  $325 \pm 50$  mU/ml, was wesentlich unterhalb des Referenzbereichs des Menschen von 400 bis 1600 mU/ml liegt. Dies scheint jedoch keine Auswirkungen auf die Blutungsneigung der Tiere zu haben und könnte eine Erklärung für die ebenfalls niedrige Adams13 Aktivität sein, da VWF bisher als einziges Substrat von Adams13 bekannt ist [2, 4].

Ein wichtiges Merkmal der TTP beim Menschen ist das Vorhandensein von ultralangen VWF Multimeren im Plasma dieser Patienten, die durch die mangelnde bzw. nicht vorhandene ADAMTS13 Aktivität verursacht werden [41]. Das Multimermuster im Plasma der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich mit dem der Wildtyp Mäuse zeigte ein

## Diskussion

dem Menschen entsprechendes Bild. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse hatten größere Multimere im Plasma als Wildtyp Mäuse und eine sehr viel schwächer ausgeprägte Triplettstruktur. Dies ist auch der Fall beim Vergleich von TTP Patientenplasma mit gesundem Humanplasma [155]. In der Gegenüberstellung von Maus- und Humanplasma zeigte sich, dass die langen Multimere der Wildtyp Mäuse jedoch oberhalb der Multimergröße des gesunden Humanplasmas lagen und in ihrer Größe vergleichbar mit den UL Multimeren der TTP Patienten waren. Die größten Multimere der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse lagen nochmals höher als die der Wildtyp Mäuse. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit jenen von Banno et al. [2]. Die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse von Motto et al. [1] unterscheiden sich jedoch von den hier verwendeten Mäusen, da sie auf einem gemischten 129/Sv und C57BL/6J Hintergrund gezüchtet wurden. Bei diesen Mäusen konnte kein Unterschied im Multimermuster festgestellt werden, sodass sowohl bei Wildtyp als auch bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen UL VWF Multimere im Plasma nachzuweisen waren. Somit fehlt diesen Mäusen der TTP-typische Phänotyp des VWF Multimerusters. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass diese Mäuse eine verkürzte Form der Adamts13 Protease besitzen, die durch den Einbau eines frühzeitigen Stopp-Codons im Adamts13 Gen zu einem verkürzten C-terminalen Ende der Protease führt und mit einer geringeren Adamts13 Aktivität einhergeht [27, 28].

Die besonders großen Multimere sind hämostaseologisch sehr viel aktiver als kleinere Multimere, was bei der Erkrankung des Von Willebrand Syndroms (VWS) deutlich wird. Patienten mit VWS Typ 2A leiden unter erhöhter Blutungsneigung, da sie einen qualitativen Defekt des VWFs haben. Dieser stellt sich im Multimermuster mit einem Mangel der großen Multimere dar. Die erhöhte thrombotische Aktivität wird durch die vermehrte Anzahl an Bindungsstellen für Thrombozyten und die Gefäßwand erklärt, was eine bessere Adhäsion bedingt. Patienten mit VWS Typ 1 haben einen quantitativen Defekt des VWFs und leiden dadurch ebenfalls unter leicht erhöhter Blutungsneigung. Betrachtet man nun den VWF:AG Gehalt sowie das VWF Multimermuster der Mäuse, könnten die physiologisch niedrigen VWF:AG Konzentrationen durch die besonders großen Multimere kompensiert werden.

Bei der Gegenüberstellung der Blutbilder der Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse zeigte sich kein Einfluss der Adamts13 Protease auf die Thrombozytenzahl, den Hämoglobingehalt und den Hämatokrit. Die durchschnittliche Leukozytenzahl der Adamts13 Mäuse war geringgradig verringert, was jedoch für die Mäuse als Modell für die TTP keine entscheidende Rolle spielte.

## Diskussion

Kollagen ist bekannt als einer der stärksten Stoffe, um eine Plättchenadhäsion und Plättchenaktivierung auszulösen [156, 157]. In gesunden Gefäßen besteht kein Kontakt zwischen Kollagenfasern und den im Blutstrom zirkulierenden zunächst inaktiven Plättchen. Kommt es zu einer Schädigung der Gefäßwand und somit zur Freilegung von Kollagenfasern, führt dies zum Kontakt zwischen Kollagen und den Plättchenrezeptoren GpVI und  $\alpha_2\beta_1$ , was mit einer Aktivierung der Thrombozyten einhergeht [157-159]. Das Stresshormon Epinephrin ist, vermittelt über einen G-Protein Rezeptor auf der Plättchenmembran, ebenfalls ein starker Aktivator der Thrombozyten. Diese Eigenschaften haben DiMinno und Silver 1983 genutzt und ein sehr simples Mausthrombosemodell entwickelt [160]. Hierbei führte die intravenöse Injektion einer Mischung aus 15  $\mu\text{g}$  Kollagen/Maus und 1,8  $\mu\text{g}$  Epinephrin/Maus bei 94% der getesteten Mäuse innerhalb von wenigen Minuten zum Tod. Die intraperitoneale Verabreichung antithrombotischer Substanzen wie z.B. Aspirin konnte die Überlebensrate der Mäuse auf 60% verbessern, sodass sich dieses Modell zunächst als Möglichkeit zur Evaluierung antithrombotischer Substanzen etablierte. Aber auch zur Untersuchung eines pro- bzw. antithrombotischen Zustands in genetisch veränderten Mäusen kann dieses Modell schnell richtungsweisende Ergebnisse liefern. So konnten Banno et al. [2] zeigen, dass die  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäuse einen prothrombotischen Status im Vergleich zu Wildtyp Mäusen aufwiesen, da die Injektion von Kollagen plus Epinephrin in  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäusen einen erhöhten Thrombozytenverbrauch verursachte. Dieses *in-vivo* Experiment wurde zur Charakterisierung der  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäuse in der vorliegenden Arbeit wiederholt (siehe Abbildung 22) und konnte den prothrombotischen Status der Mäuse bestätigen. Einen weiteren Nachweis des prothrombotischen Status lieferten Banno et al.[2] in einem *ex-vivo* Flusskammerversuch. Hierbei wurde die Thrombusbildung in Vollblut von Wildtyp und  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäusen in Kollagen-beschichteten Flusskammern verglichen. Es konnte kein Unterschied in der primären Adhäsion der Plättchen an Kollagen festgestellt werden, wobei das Thrombusvolumen im Vollblut der  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäuse nach 3,5 min rapide anstieg und sich ein signifikanter Unterschied im Thrombusvolumen der  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen nach 5,5 min darstellte. Motto et al. [1] konnten ebenfalls einen prothrombotischen Status ihrer  $\text{Adamts13}^{-/-}$  Mäuse zeigen. Sie untersuchten intravitalmikroskopisch die Plättchenadhäsion in Mesenterialgefäßen von  $\text{Adamts13}^{-/-}$  und Wildtyp Mäusen nach Stimulation der Ausschüttung von UL VWF aus den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen. Auch hier war kein Unterschied in der initialen Plättchenadhäsion zu erkennen, wobei die Thrombozytenadhäsion in den Mesenterialgefäßen der Wildtyp Mäuse schnell nachließ und sich innerhalb 5 min wieder die Ausgangssituation

## Diskussion

einstellte. Bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich dagegen eine verlängerte Adhäsion der Plättchen über 8 bis 15 min, die bei einzelnen Knockout Mäusen auch über den gesamten Beobachtungszeitraum von 35 min anhielt.

Da bei der Entstehung der TTP viele verschiedene Faktoren (ADAMTS13, von Willebrand Faktor, Thrombozyten, Endothelzellen, extrazelluläre Matrix u.a.) beteiligt sind und die Strömungsbedingungen des Blutes hierbei eine wichtige Rolle spielen, lässt sich die Entwicklung der TTP bisher nur an intakten Organismen, also am Menschen oder an Versuchstieren, untersuchen. Neben den Mausmodellen der angeborenen TTP entwickelten Feys et al. [161] ein TTP Modell im Bärenpavian. Hierbei handelte es sich um ein Tiermodell der erworbenen TTP. Die ADAMTS13 Defizienz wurde durch mehrmalige Injektion eines anti-ADAMTS13 Antikörpers ausgelöst und führte innerhalb weniger Stunden zu einer starken Thrombozytopenie mit Schistozyten im Blutausschlag, massivem LDH-Anstieg sowie Hämoglobin- und Haptoglobin-Abfall. TTP-typische Mikrothrombosen waren in Niere, Herz, Gehirn und Milz nachweisbar, nicht jedoch in der Lunge. Interessanterweise wurde das VWF-Multimermuster durch die Behandlung nicht verändert. Es waren keine UL-VWF Multimere nachweisbar. Die Tiere entwickelten zwar innerhalb kürzester Zeit ein sehr typisches hämatologisches Bild der TTP, das Allgemeinbefinden der Tiere war während des Beobachtungszeitraums von 4 Tagen jedoch nicht beeinträchtigt und die Blutwerte normalisierten sich innerhalb von 4 Tagen nach Absetzen der Antikörper Injektion wieder. Das Modell eignet sich somit sehr gut für Untersuchungen der frühen Phase der TTP, die auf Grund der fehlenden klinischen Symptome beim Menschen meist unbemerkt verläuft [41, 161-163]. Aber auch zur Untersuchung von neuen Behandlungsmethoden ist dies ein gutes Modell, da es bei allen behandelten Tieren TTP-typische Laborwerte auslöste, ohne das Allgemeinbefinden der Tiere zu beeinträchtigen [161, 164]. Die TTP-typischen Veränderungen wurden ausschließlich durch die ADAMTS13 Defizienz ausgelöst ohne zusätzliche Triggerfaktoren. Interessanterweise entwickelten die Kontrolltiere dieser Untersuchungen ebenfalls einen leichten ADAMTS13 Abfall, was jedoch keinerlei Symptome auslöste. Die Tiere, die mit inhibitorischem Antikörper behandelt wurden, zeigten einen so starken ADAMTS13 Abfall, dass keine Aktivität mehr messbar war. Dies bestätigt die Hypothese von Bianchi et al. [165], dass ein bestimmter Schwellenwert an ADAMTS13 Aktivität (<5%) unterschritten werden muss, um spontan TTP-typische Symptome auszulösen. Abgesehen davon, dass es sich um ein Modell der erworbenen TTP handelt, unterscheidet sich somit das Pavianmodell deutlich vom Mausmodell der TTP, wo eine angeborene ADAMTS13-Defizienz alleine noch keine spontane TTP auslöst.

Ob die Mäuse den angeborenen Verlust von Adamts13 mit anderen Proteasen kompensieren, wie z.B. Elastase, Proteinase 3 oder Cathepsin G, die ebenfalls VWF spalten können [166], ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Forschung. Ebenso ist es bislang nicht ausreichend untersucht, ob zusätzliche, bislang unbekannte Faktoren vorhanden sein müssen, die z.B. eine Endothelschädigung bewirken.

Insgesamt gesehen entsprechen die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch in vielerlei Hinsicht Patienten mit angeborener TTP. Sie hatten keine nachweisbare enzymatische Aktivität der Adamts13, was mit UL VWF Multimeren im Plasma und einem prothrombotischen Zustand einherging. Dennoch entwickelten die Mäuse keine spontane TTP.

Somit ist es möglich mit Hilfe dieses Mausmodells der angeborenen TTP weitere Triggerfaktoren und deren zugrunde liegende Pathophysiologie zu erforschen. Dennoch liefert es keine Erklärung für ein scheinbar spontanes Auftreten der TTP bei einigen Patienten mit schwerem ADAMTS13 Mangel, sodass eine Übertragung auf den Menschen bei diesem murinen Modell der TTP nur begrenzt möglich ist.

## 5.2 DIE ROLLE DES VWFs ALS TRIGGERFAKTOR FÜR DIE TTP

Dass der VWF eine entscheidende Rolle bei der Erkrankung der TTP spielt, ist unumstritten. Der Nachweis UL VWF Multimere im Plasma von TTP Patienten ist neben dem Mangel an ADAMTS13 eines der Hauptkriterien in der Diagnosestellung der TTP [96]. Gleichzeitig scheint das Vorkommen dieser UL VWF Multimere nicht alleine ausschlaggebend für den Eintritt eines akuten Krankheitsschubes zu sein, da es TTP-Patienten gibt, die sowohl während eines akuten TTP-Schubes als auch innerhalb langer Remissionsphasen nachweisbar UL VWF Multimere im Plasma haben [164]. Dies ist vergleichbar mit den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Der alleinige Knockout der Adamts13 Protease mit den daraus resultierenden UL VWF Multimeren im Blut dieser Tiere löst keine TTP typischen Symptome aus [2].

Eine unphysiologisch hohe Injektion rhVWFs in die Schwanzvene dieser Tiere führte dagegen innerhalb weniger Minuten zu einem starken Thrombozytenabfall mit Auftreten weiterer TTP-typischer Symptome. Die Mäuse zeigten in unterschiedlich starkem Ausmaß neurologische Ausfallerscheinungen, hatten Fragmentozyten im Blutausschlag sowie einen starken LDH Anstieg und einen Abfall des Hämatokrits im Blut [123]. Die histologischen Veränderungen waren jedoch nicht übereinstimmend mit denen des Menschen. Die stärksten Veränderungen zeigten sich bei den Mäusen im Herzen. Dort kam es zu Einblutungen, Nekrosen sowie Einwanderung von Entzündungszellen. In der Niere waren Nekrosen der Tubuli zu erkennen. Im Gehirn, welches eines der am meisten betroffenen Organe beim Menschen ist, waren dagegen

## Diskussion

keine Veränderungen nachweisbar. Trotz der heftigen Reaktionen dieser Mäuse auf die Injektion des rhVWF, führte die Behandlung nicht zum Tod der Tiere. Bis auf interstitielle Fibrosen im Herzen, scheinen sich die Mäuse innerhalb von 14 Tagen komplett erholt zu haben.

Im Vergleich dazu führte die gleiche Konzentration (2000 RCoU) eines humanen VWF Konzentrates dagegen nicht zu TTP-typischen Symptomen in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Mäuse zeigten keinerlei Veränderungen des Verhaltens und die Thrombozytenzahlen waren nach 8 h unverändert (siehe Abbildung 32). Auch die doppelte Dosierung des VWF Konzentrats löste keine Thrombozytopenie aus. Somit kann alleine die Erhöhung des VWF Antigenspiegels im Blut der Mäuse nicht ausschlaggebend für die Entwicklung der TTP sein.

Bei der Gegenüberstellung der Multimermuster des rhVWFs und des humanen VWF Konzentrates war ein deutlicher Unterschied zu erkennen (siehe Abbildung 34 und Abbildung 35). Im Multimermuster des rhVWF waren UL VWF Multimere nachweisbar, Triplettbanden fehlten jedoch. Dies bestätigt, dass rhVWF bei seiner Herstellung keinerlei Kontakt zu ADAMTS13 hatte. Im Gegensatz dazu fehlten die UL Multimere im humanen VWF Konzentrat und es waren klare Triplettbanden zu erkennen, sodass das Multimermuster des VWF Konzentrats dem gesunder Probanden mit ADAMTS13 Aktivität entsprach. Dies lässt den Rückschluss ziehen, dass insbesondere die Erhöhung der UL VWF Multimere als Triggerfaktor bedeutend ist, was auch vergleichbar mit den Ergebnissen von Motto et al. [1] ist. Die zunächst auf einem gemischten C57BL/6J und 129X1/SvJ Hintergrund gezüchteten Adamts13-defizienten Mäuse entwickelten sich komplett normal ohne spontane Anzeichen einer TTP. Eine Rückkreuzung der Mäuse mit CASA/Rk Mäusen, die einen 5–10-fach höheren VWF Spiegel im Blut haben [167] und durch die Adamts13-Defizienz UL VWF Multimere im Vergleich zu ihren Kontrollen entwickelten, führte zu TTP-typischen Symptomen bei diesen Mäusen. Einige dieser Mäuse wiesen spontane mikroangiopathische Veränderungen auf. Sie zeigten eine Thrombozytopenie mit Fragmentozyten im Blutaussstrich, VWF-reiche und Fibrin-arme hyaline Mikrothrombosen in verschiedenen Organen, unter anderem auch im Gehirn, und starben früher als die Wildtyp Kontrolltiere. Shigatoxin (Stx) als zusätzlicher Triggerfaktor löste in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen mit gemischtem C57BL/6J und 129X1/SvJ Hintergrund keine TTP-typischen Symptome aus. Nach Rückkreuzung mit CASA/Rk Mäusen und somit bedingtem erhöhtem VWF:AG Spiegel im Blut, führt die Behandlung mit Stx zur Ausbildung einer Thrombozytopenie mit Fragmentozyten und TTP-typischen Mikrothrombosen in verschiedenen Organen [1]. Somit scheint der VWF wiederum ausschlaggebend für die



erhöhte Empfindlichkeit für TTP-typische Symptome bei diesen Mäusen zu sein, auch wenn keine Korrelation zwischen erhöhtem VWF Antigen Spiegel und erhöhter Mortalität, basalem Thrombozytenwert und Stärke der Thrombozytopenie zu erkennen war. Dies spricht gegen eine alleinige Erhöhung des VWF:AG Spiegels als Triggerfaktor für TTP, sodass wahrscheinlich die strukturelle Zusammensetzung des VWFs die entscheidende Rolle spielt.

Eine endogene Erhöhung des VWF:AG Spiegels durch intraperitoneale Injektion von Histamin, was die Ausschüttung des VWFs aus Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen und  $\alpha$ -Granula der Plättchen stimuliert [60, 124, 137, 168], führte zu einer maximalen Erhöhung des VWF:AG Spiegels auf das Doppelte des Ausgangswertes (siehe Abbildung 37). Dies reichte nicht aus, um TTP-typische Symptome in Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen auszulösen (siehe Abbildung 39). Im Vergleich dazu führte die Injektion von 2000 RCoU rhVWF bzw. Wilfactin zu einem 20- bis 50-fachen Anstieg des VWF:AG Spiegels im Blut der Mäuse. Diese extrem hohe Dosierung führte allerdings nicht nur zu einem Abfall der Thrombozytenzahlen im Blut der Adams13<sup>-/-</sup> Mäuse um über 90%, sondern auch zu einem Abfall der Thrombozytenzahlen bei Wildtyp Mäusen um ca. 30%. In wie weit man diese Konzentration weiter senken kann, um bei Adams13<sup>-/-</sup> Mäusen immer noch TTP-typische Symptome auszulösen, ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung.

Es scheint allerdings so, dass insbesondere die Qualität aber auch die Quantität des VWFs eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der TTP spielen [164] und ein Schwellenwert an UL VWF Multimeren im Blut der Mäuse benötigt wird, um eine ausreichend starke Thrombozytenaktivierung auszulösen, die mit TTP-typischen Symptomen einhergeht.

### **5.3 DIE HISTON-INDUZIERTER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG IST BEI ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN GERINGER AUSGEPRÄGT ALS BEI 129/SV MÄUSEN**

Histone sind kleine basische Proteine, die hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sind und hierbei für die Organisation der DNA in Form von Nukleosomen verantwortlich sind. Extrazellulär konnten Histone sowohl bei kranken als auch gesunden Probanden im Blut nachgewiesen werden. Die Ausschüttung von Histonen kann infolge des Zelltods auftreten [169]. Neutrophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen können aber auch aktiv Histone ausschütten, was mit der Bildung von „NETs“ (engl. neutrophil extracellular Traps) einhergeht und auch als „NETosis“ bezeichnet wird [170-172].

## Diskussion

Hierbei handelt es sich um einen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems.

Fuchs et al. [138] bestimmten die Konzentration an DNA und Histonen im Plasma verschiedener TMA Patienten (TTP, HUS, krebs-assoziierte TMA und TMA Patienten unklarer Genese) während eines akuten Krankheits-Schubes und in Remission. Dabei konnten sie zeigen, dass im Plasma dieser Patienten während des akuten Krankheits-Schubes stark erhöhte Werte an DNA und Nukleosomen nachweisbar waren. Sie stellten daher die Hypothese auf, dass Histone als mögliche zusätzliche Triggerfaktoren („second hit“) agieren und insbesondere in Adamts13-defizienten Patienten die Auslösung eines akuten TTP-Schubes begünstigen. Außerdem kamen sie zu dem Ergebnis, dass vor allem bei Patienten mit dauerhaft niedrigen ADAMTS13 Werten die Messung von DNA, Histonen und Myeloperoxidase als Biomarker für einen akuten Schub dienen kann, da die Konzentration dieser Stoffe nur während des Schubes stark anstieg und sich innerhalb der Remission wieder normalisierte.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen ADAMTS13 und Histon-abhängiger Thrombozytenaktivierung und Thrombose zu untersuchen, wurden Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse und die entsprechenden Wildtyp Mäuse intravenös mit Histonen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt.

Die intravenöse Injektion von Histonen in Mäuse führt zu einer bevorzugten Bindung der Histone an Thrombozyten mit daraus resultierender Thrombozytenaktivierung [148]. Diese wird unter anderem durch einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg mit darauf folgender Aktivierung der  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  Integrine ausgelöst und führt zur Vernetzung von Thrombozyten über Fibrinogen [148, 173]. Außerdem führen Histone zu einer verstärkten Thrombin-Bildung, die über die Thrombozytenrezeptoren TLR2 und TLR4 vermittelt wird [174]. Es kommt innerhalb weniger Minuten zur Bildung von Histonreichen Thrombozytenaggregaten in der Lunge mit einer stark ausgeprägten Thrombozytopenie und bei entsprechender Dosierung führen Histone letztendlich zum Tod der Tiere innerhalb weniger Minuten [148, 175]. Die klinischen Symptome der stark ausgeprägten Thrombozytopenie und die Thrombozytenaggregate in der Lunge sind vergleichbar mit den typischen Symptomen eines akuten TTP-Schubes beim Menschen. Ein weiterer Faktor, der die „second hit“-Hypothese verstärkt, ist die Tatsache, dass Histone die Ausschüttung von VWF aus Endothelzellen und Thrombozyten bewirken [176] sowie die zytotoxische Wirkung von Histonen auf Endothelzellen [175]. Der gemeinsame Mechanismus der Triggerfaktoren, über eine Aktivierung des Endothels oder aber auch durch Endothelzellschädigung und der daraus resultierenden Ausschüttung von UL VWF aus den Weibel-Palade-Körperchen

den Ausbruch eines akuten TTP-Schubes zu bewirken, wird seit längerer Zeit diskutiert [41, 88, 137, 164, 177].

Dennoch konnten keine Unterschiede in der Histon-abhängigen Thrombozytenaktivierung bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu deren Wildtyp Kontrolltieren bei hoher Dosierung festgestellt werden (siehe Abbildung 40). Die hochgradige Thrombozytopenie bei einer Dosierung von 50 mg/kg KGW Histone, die innerhalb 15 min nach Injektion eintrat, lag bei beiden Versuchsgruppen bei über 90%. Auch bei einer Dosierung von 25 mg/kg KGW Histone konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Bei einer sehr niedrigen Dosierung der Histone von 12,5 mg/kg KGW reagierten die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse überraschenderweise mit einem geringeren Thrombozytenverbrauch als die entsprechenden Wildtyp Mäuse. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese von Fuchs et al., die Histone als „second hit“ bei Adamts13-defizienten Patienten diskutierten. Weshalb die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse mit einem geringeren Thrombozytenverbrauch reagierten, ist noch unklar und bedarf weiterer Forschung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte allerdings die Bindung von Histonen an VWF darstellen [178, 179]. Der bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen im Plasma zirkulierende UL VWF weist mehr Bindungsstellen für Proteine auf als VWF in nicht ultralanger Form [60, 180]. Histone sind positiv geladene Proteine und binden an VWF in der A1 Domäne, die negativ geladen ist [179]. Diese Bindung der Histone an VWF beeinflusst allerdings nicht die VWF bedingte Thrombozytenaktivierung durch Ristocetin bzw. Botrocetin [179]. Somit wäre eine mögliche Erklärung für den geringeren Thrombozytenverbrauch in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen, dass der bei diesen Mäusen vorkommende UL VWF einen höheren Anteil der injizierten Histone abfängt als bei 129/Sv Wildtyp Mäusen ohne UL VWF. Somit würden weniger Histone für die Interaktion mit Thrombozyten im Plasma zirkulieren, was eine geringere Histon-abhängige Thrombozytenaktivierung erklären könnte. Diese Hypothese würde allerdings dafür sprechen, dass Patienten mit dauerhaft niedriger ADAMTS13 Aktivität und somit zirkulierendem UL VWF im Plasma gegen geringe Mengen an Histonen und der damit verbundenen Thrombozytenaktivierung geschützt sind. Die hohen Histon Werte während eines akuten TTP Schubes wären somit lediglich eine negative Begleiterscheinung der TTP-Schübe. Entzündungen und Infektionen stellen mit die häufigsten Ursachen für einen akuten TTP-Schub dar [181, 182]. Neutrophile Granulozyten reagieren auf Infektionen und damit meist einhergehenden Entzündungen mit einer Ausschüttung von NETs [171]. Diese bestehen hauptsächlich aus DNS, Histonen und weiteren antimikrobiellen Proteinen, was die hohen Histonkonzentrationen während der Schübe erklären kann

[171]. Somit kann die Messung der Histonkonzentration während eines TTP-Schubes zwar als Anhaltspunkt für die Schwere des Schubes dienen [138], es scheint jedoch so, als dass Histone selbst nicht für die Auslösung des TTP- Schubes verantwortlich sind.

#### **5.4 DIE ROLLE VON ADAMTS13 BEI CHININ-BEDINGTER THROMBOZYTOPENIE**

Chinin, ein Alkaloid, das aus der Chinarinde gewonnen wird, wird unter anderem als Bitterstoff in Lebensmitteln aber auch in Medikamenten eingesetzt. Die häufigste medikamentöse Anwendung findet es als Mittel gegen nächtliche Wadenkrämpfe, wogegen es schon seit über 60 Jahren eingesetzt wird. Aufgrund vieler unerwünschter Nebenwirkungen ist sein Einsatz mittlerweile sehr umstritten. Es kann gastrointestinale Störungen auslösen, hat neurotoxische und nephrotoxische Wirkungen, führt bei hoher Dosierung zu einem starken Blutdruckabfall und ist neben Mitomycin C, Cyclosporin, und Ticlopidin mit eines der 4 häufigsten Medikamente, die eine Thrombozytopenie beim Menschen auslösen können [183]. Ein Zusammenhang zwischen ADAMTS13 und der Chinin-bedingten Thrombozytopenie ist noch nicht ausreichend geklärt, weshalb die Wirkung von Chinin in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden sollte.

Hierfür wurden zwei unterschiedliche Modelle angewendet. Zunächst wurde getestet, welche Folgen eine einmalige hochdosierte orale Chinin-Gabe bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen hat, da mehrere Fälle beschrieben sind, bei denen die einmalige Chinineinnahme zur Auslösung einer TTP führte [139, 141, 142].

Da den meisten Chinin-bedingten Thrombozytopenien eine längere Chinineinnahme voraus ging und dabei auch meist die Entwicklung Chinin-abhängiger Antikörper gegen Thrombozyten und teilweise auch gegen weitere Blutzellen beobachtet werden konnte [184-188], wurde in einem zweiten Versuchsmodell die Chinin-Gabe kontinuierlich über das Trinkwasser über einen Zeitraum von 3 Wochen durchgeführt. Nach einer Chinin-freien Zeit von weiteren zwei Wochen wurde nochmals eine einmalige hohe Dosis Chinin verabreicht, um eine mögliche Sensitivität gegenüber Chinin zu überprüfen.

Entgegen der Erwartungen konnte in beiden Versuchsmodellen sowohl bei den Adamts13<sup>-/-</sup> als auch bei den Wildtyp Mäusen kein Einfluss des Chinins auf die Blutbilder, insbesondere die Thrombozytenzahlen, der Mäuse festgestellt werden (Siehe Abbildung 41 und Abbildung 48).

Die Chinin-abhängige Thrombozytopenie wird immer wieder in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der TTP beschrieben, wobei die Bezeichnung TTP in diesem Zusammenhang mittlerweile umstritten ist. In ersten Berichten über Chinin und dessen

## Diskussion

Wirkung auf Thrombozyten und andere Blutzellen, wurden die Krankheitsbilder unterschiedlich bezeichnet. Allen gemeinsam war jeweils die plötzlich auftretende und sehr starke Thrombozytopenie [139, 140, 189-193]. Weitere Krankheitssymptome waren jedoch recht unterschiedlich. Webb et al. [190] berichteten 1980 von einer Chinin bedingten akuten intravasalen Hämolyse während Spearing et al.[191] im selben Jahr drei Fälle von Chinin verursachter disseminierter intravasaler Gerinnung beschrieben. Bei allen drei Fällen handelte es sich um Frauen, die Chinin-haltige Tabletten gegen Wadenkrämpfe einnahmen und bei allen drei Frauen konnten Antikörper gegen Thrombozyten nachgewiesen werden. Barr et al. [192] sprachen nach wiederholtem Auftreten von akutem Nierenversagen zusammen mit starker Thrombozytopenie bei einer 63-jährigen Frau von einer Chinin-Hypersensitivität. Das Nierenversagen trat das erste Mal wenige Stunden nach der Einnahme eines Chinin-haltigen Sedativums auf, die beiden weiteren Male waren Chinin-haltige Getränke Ursache für das Nierenversagen. Sie diagnostizierten eine disseminierte intravasale Gerinnung mit sekundärer Thrombozytopenie. Auch Belkin [189] berichtete bereits 1967 von einer Chinin-Sensitivität. Hierbei reagierte eine junge Frau wiederholt mit starkem Thrombozytenabfall nach dem Genuss einiger Chinin-haltiger Cocktails. Er bezeichnete die Erkrankung daher als „Cocktail purpura“ und konnte zeigen, dass die Thrombozytopenie Folge der Zerstörung von Thrombozyten auf Grund von Autoantikörpern war, welche nur in Gegenwart von Chinin stattfand. Weitere Untersuchungen auf Chinin-abhängige Antikörper bestätigten diese Beobachtungen und zeigten, dass insbesondere die Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX auf der Thrombozytenmembran Epitope für die Chinin-abhängigen Antikörper darstellten [184, 185, 188, 194, 195]. Chinin-bedingte Antikörper gegen andere Zellen (Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Endothelzellen) wurden ebenfalls beschrieben [140, 186, 193, 196, 197].

Sehr häufig wurde von Chinin-bedingtem Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) berichtet ([139, 140, 183, 197-201]). Die Krankheitsbilder TTP und HUS ähneln sich stark und konnten lange Zeit kaum auseinander gehalten werden, sodass häufig die gemeinsame Bezeichnung TTP-HUS verwendet wurde. Waren die neurologischen Ausfälle stärker, so sprach man eher von TTP. War die Niereninsuffizienz das dominierende Symptom, so bezeichnete man die Erkrankung als HUS [41, 202]. Erst nach weiterer Erforschung der Pathophysiologie der beiden TMAs, konnten klarere diagnostische Kriterien festgelegt werden. Thompson und Winterborn stellten 1981 den Zusammenhang zwischen Störungen des alternativen Weges des Komplementsystems und atypischem HUS (aHUS) fest [203]. Eculizumab, ein

humanisierter monoklonaler Antikörper gegen Komplementfaktor C5 hemmt den gesamten alternativen Signalweg des Komplementsystems und wird seit 2011 zur Behandlung von aHUS empfohlen [204, 205]. Obwohl auch schon bei TTP Patienten Störungen des Komplementsystems festgestellt werden konnten, scheint dies bei der Pathophysiologie der TTP eine untergeordnete Rolle zu spielen [206-208]. Eines der wichtigsten diagnostischen Merkmale der TTP ist mittlerweile eine stark verminderte ADAMTS13-Aktivität (<5%), wohingegen die ADAMTS13-Aktivität bei HUS und anderen TMAs meist über 10% liegt [82, 177, 209]. Die Aktivität von ADAMTS13 wurde jedoch in den meisten Berichten über Chinin-bedingte Thrombozytopenien zunächst nicht untersucht. Vesely et al. [163] berichteten 2003, dass in 12 von 12 Chinin-bedingten TTP/HUS-Fällen kein ADAMTS13 Mangel vorlag und Park et al. [210] konnten dies 2009 mit weiteren 6 Chinin-bedingten TMA Patienten bestätigen. Sie befürworteten daher die Bezeichnung Chinin-TMA anstelle von Chinin-TTP/HUS. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Chinin und ADAMTS13 in Mäusen zeigten. Eventuell spielen aber hierbei auch die Unterschiede zwischen Maus und Mensch eine Rolle.

Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Chinin-bedingten thrombotischen Mikroangiopathie möglicherweise nicht um eine TTP, sondern eher um eine Immunthrombozytopenie mit Autoantikörpern gegen Thrombozyten handelt und ADAMTS13 hierbei wahrscheinlich keine entscheidende Rolle spielt.

### **5.5 BAKTERIELLE ENTZÜNDUNGEN UND PILZINFEKTIONEN DER LUNGE SIND KEINE TRIGGERFAKTOREN FÜR TTP BEI ADAMTS13<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Sowohl leichte als auch schwere Entzündungen bis hin zur Sepsis gehen sehr häufig einem akuten TTP Schub voraus [138, 182, 211]. Daher werden Entzündungen, bzw. die damit einhergehenden Immunreaktionen als Triggerfaktoren für TTP beim Menschen diskutiert. Entzündungen führen zu einer Ausschüttung von VWF aus den Endothelzellen und gleichzeitig sinkt der Gehalt an ADAMTS13 im Plasma, sodass schon bei verschiedenen Entzündungsreaktionen eine inverse Korrelation zwischen dem Antigengehalt von VWF und ADAMTS13 nachgewiesen werden konnte [212-216]. Wie schon in Kapitel 5.2 diskutiert, scheint VWF eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung akuter TTP-Schübe zu spielen. Gleichzeitig ist er entscheidend an der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion während Entzündungsprozessen beteiligt und hierbei mit verantwortlich für die Entstehung von Multiorganschäden durch multiple Mikrothrombosen [217], typische Symptome der TTP. Ob Entzündungen bei

## Diskussion

Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen eine TTP auslösen, wurde mit zwei verschiedenen Entzündungsmodellen untersucht.

Zunächst wurden die Auswirkungen der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen analysiert. LPS ist Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und führt zu einer schnellen und starken Entzündungsreaktion mit Aktivierung von akute Phase Proteinen, unter anderem IL-6 [218]. IL-6 hemmt die Spaltung von UL VWF durch ADAMTS13, während die proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF $\alpha$  die Ausschüttung von UL VWF aus Endothelzellen stimulieren [219]. Erhöhte VWF:AG Konzentrationen im Plasma von Sepsis Patienten gelten als frühzeitiger Indikator für akute Lungenschädigung, während eine verringerte ADAMTS13 Aktivität mit einer schlechten Prognose bei Sepsis-induzierten Organschäden einhergeht [216, 220]. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit den Beobachtungen von Mimuro et al., die einen starken Anstieg des VWFs mit messbaren UL VWF und gleichzeitigem Abfall der ADAMTS13 Aktivität im Plasma von C57BL/6 Mäusen nach intraperitonealer Injektion von LPS nachweisen konnten [221]. Sie folgerten daraus, dass das Missverhältnis zwischen VWF und ADAMTS13 ursächlich für den thrombotischen Status bei Endotoxämie ist [221]. Des Weiteren führt LPS zu einer Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen und wird auch daher als möglicher Auslöser von TMAs diskutiert [222-224]. Obwohl sich die ADAMTS13<sup>-/-</sup> Mäuse bereits vor Behandlung in einem prothrombotischen Status befanden und die intratracheale Verabreichung von LPS eine starke Entzündungsreaktion mit besonders starkem Anstieg von IL-6 bei ADAMTS13<sup>-/-</sup> Mäusen (unveröffentlichte Daten von M. Bosmann) auslöste, konnte keine Thrombozytopenie als Anhaltspunkt für eine TTP festgestellt werden (siehe Abbildung 49). Somit konnte die LPS induzierte akute Lungenschädigung als Trigger für TPP bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen ausgeschlossen werden. Auch bei der *Aspergillus fumigatus* bedingten Pneumonie konnte eine starke Entzündungsreaktion der Mäuse nachgewiesen werden [225], dennoch wurde auch hier keine Thrombozytopenie ausgelöst (siehe Abbildung 51). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Lerolle et al., die eine durch Ligatur und Punktion des Cäcums ausgelöste Sepsis in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen untersuchten [215]. In diesem Sepsis Modell konnte zwar eine starke Erhöhung der VWF:AG Konzentration mit gleichzeitig starkem Abfall der Adamts13 Aktivität in Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden, TTP-typische Symptome wie Thrombozytopenie, Mikrothrombosen in Leber oder Niere und eine verkürzte Überlebensdauer in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen lagen jedoch nicht vor [215]. In einem durch intraperitoneale LPS-Injektion ausgelösten Endotoxämie/Sepsis Modell konnte ebenfalls kein Unterschied in der Stärke der

## Diskussion

Thrombozytopenie zwischen Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen festgestellt werden [4]. All diese Beobachtungen unterscheiden sich stark von den Beobachtungen der TTP beim Menschen, sodass man davon ausgehen kann, dass bakterielle Entzündungsreaktionen und Pilzinfektionen der Lunge bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen im Gegensatz zum Menschen keine entscheidende Rolle als Triggerfaktoren für TTP spielen.

Neben der fehlenden Thrombozytopenie nach Auslösung der Entzündungen in der Lunge zeigten die Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch Auffälligkeiten bei der Immunreaktion auf die Entzündungen. Sowohl bei der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung (unveröffentlichte Daten von M.Bosmann) als auch im *A. fumigatus* Modell führten die ausgelösten Entzündungen zu deutlich verminderten Leukozytenzahlen im Blut der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen und gleichzeitig waren auch weniger Leukozyten in der Bronchoalveolarlavage der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse nachweisbar (siehe Abbildung 50 sowie Abbildung 52 und Abbildung 54). Diese Beobachtungen wurden im Modell der *A.fumigatus* Pneumonie weiter untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die verringerte Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen sowohl im Blut als auch in der Lunge zu einer stärkeren Ausbreitung der Pilze und einer geringeren Überlebensrate der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse führte (siehe Abbildung 55 und Abbildung 56). Da keine Defizite in der Funktion der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden konnten, scheint eine gestörte Migration der neutrophilen Granulozyten bei den Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen ursächlich für die stärkere Ausbreitung der Pilze und die geringere Überlebensrate zu sein [225] und deutet darauf hin, dass Adamts13 nicht nur antithrombotische sondern auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Verschiedene Gruppen konnten bereits zeigen, dass VWF die Leukozyten-Adhäsion fördert und Thrombozyten gebunden an UL VWF zu einem erhöhten „Rollen“ der Leukozyten führt [226, 227]. Auch in Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich ein erhöhtes Rollen der Leukozyten in unstimulierten Mesenterialgefäßen - ein Effekt, der durch die zusätzliche VWF-Defizienz aufgehoben werden konnte [124]. Gleichzeitig entwickelten diese Mäuse allerdings eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten in die entzündeten Gebiete, sowohl in einem Peritonitis- als auch in einem Wundheilungs-Modell, was sich von den beiden Pneumonie-Modellen unterscheidet [124]. Eine antiinflammatorische Wirkung von Adamts13 mit verstärkter Einwanderung von Leukozyten in entzündete Areale konnte auch in verschiedenen Herzinfarkt und Schlaganfall-Modellen nachgewiesen werden [126, 127, 129]. Somit scheint Adamts13 in verschiedenen Entzündungsmodellen in Mäusen



## Diskussion

die Leukozyten-Rekrutierung unterschiedlich zu beeinflussen, was sich jedoch bei allen Modellen als antiinflammatorische Eigenschaft von ADAMTS13 äußerte.

Entzündungen scheinen zwar keine bedeutende Rolle als Triggerfaktoren der TTP bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen zu spielen, allerdings deuten verschiedene Entzündungsmodelle darauf hin, dass Adamts13 eine entscheidende Rolle bei der Regulation akuter Entzündungsprozesse durch Leukozyten hat. Wie genau Adamts13 die Leukozyten-Rekrutierung beeinflusst, ist allerdings noch unklar und bedarf weiterer Forschung.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloprotease ADAMTS13 spaltet den VWF im Plasma in kleinere Multimere und verhindert somit eine spontane Thrombozytenbindung an ultralangen VWF. Ein Mangel oder Fehlen dieser Protease führt zum Krankheitsbild der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), die durch das Auftreten einer hämolytischen Anämie und Thrombozytopenie mit multiplen Mikrothromben charakterisiert ist. Unbehandelt endet eine TTP in 90% der Fälle tödlich. Für die Auslösung der typischen TTP-Symptomatik sind Triggerfaktoren nötig. Einige davon sind bekannt, wie z.B. Infektionen und Medikamente. Der Mechanismus dieser Auslösung ist jedoch noch unbekannt. Um die Pathophysiologie der Erkrankung besser zu erforschen, entwickelten zwei unabhängige Forschergruppen Adamts13-defiziente (Adamts13<sup>-/-</sup>) Mäuse. Da diese unbehandelt keinerlei Krankheitssymptome zeigen und nur durch den zusätzlichen Einsatz von Triggerfaktoren TTP-typische Laborwerte entwickeln, eignen sie sich gut zur weiteren Erforschung der TTP. Ziel dieser Arbeit war es, ein Mausmodell der TTP zu etablieren und weitere Triggerfaktoren in diesem Mausmodell zu untersuchen. Hierfür wurden Adamts13<sup>-/-</sup> Mausembryonen aus Japan bezogen und eine Adamts13<sup>-/-</sup> Zucht aufgebaut. Adamts13 war bei diesen Mäusen weder im Blut noch in Leber und Knochenmark nachweisbar. Blutanalysen der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keine Unterschiede der Thrombozytenzahlen, der VWF:AG Konzentration, keine Fragmentozyten und keine Veränderung des Hämatokrits im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Durch das Fehlen der Protease im Blut waren UL VWF Multimere messbar und ein prothrombotischer Status konnte mit Hilfe des Kollagen/Epinephrin Thrombose-Modells bestätigt werden, sodass diese Tiere ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Triggerfaktoren der TTP darstellten. Die i.v. Injektion von rhVWF führte bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen innerhalb weniger Minuten zur Entwicklung TTP-typischer Laborwerte, insbesondere zu einer starken Thrombozytopenie, wohingegen Wildtyp Mäuse einen minimalen Thrombozytenabfall zeigten. Ein humanes VWF-Konzentrat, das keine UL VWF Multimere enthält, ebenso wie die endogene Erhöhung des VWFs im Blut der Mäuse durch Histamininjektion, lösten dagegen weder bei den Adamts13<sup>-/-</sup> noch bei den Wildtyp Mäusen einen Thrombozytenabfall aus. Dies lässt darauf schließen, dass insbesondere die Qualität, aber auch die Quantität des VWFs entscheidend für die Entwicklung eines akuten TTP-Schubes sind.

Chinin ist einer der häufigsten medikamenten-induzierten Triggerfaktoren der TTP beim Menschen. In den meisten beschriebenen Fällen führte eine kontinuierliche Einnahme von Chinin gegen nächtliche Wadenkrämpfe zur Entwicklung einer TTP,

## Zusammenfassung

aber auch die einmalige Aufnahme von Chinin durch Chinin-haltige Getränke kann einen TTP Schub auslösen. Daher wurde sowohl die akute Wirkung hochdosierten Chinins als auch die Langzeitexposition geringer Mengen Chinins in Adamts13<sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen untersucht. Beide Versuchsprotokolle zeigten jedoch keinerlei Einfluss des Chinins auf das Allgemeinbefinden und Blutbild der Mäuse.

Histone, die eine direkte Thrombozytenaktivierung bewirken und bei TTP-Patienten während akuter Schübe im Blut stark erhöht sind, führten sowohl bei Adamts13<sup>-/-</sup> als auch bei Wildtyp Mäusen innerhalb weniger Minuten zu einer konzentrationsabhängigen Thrombozytopenie. Diese war überraschenderweise bei niedriger Histonkonzentration bei Wildtyp Mäusen stärker ausgeprägt als bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen. Histone scheinen somit eine untergeordnete Rolle bei der Auslösung akuter TTP-Schübe zu spielen.

Die LPS-induzierte akute Lungenschädigung ebenso wie die Infektion mit *Aspergillus fumigatus* konnten auch keine Thrombozytopenie bei Adamts13<sup>-/-</sup> Mäusen auslösen, sodass bakterielle Entzündungen und Pilzinfektionen der Lunge wahrscheinlich keine entscheidende Rolle bei TTP spielen. Allerdings zeigte sich hierbei eine schlechtere Immunantwort der Adamts13<sup>-/-</sup> Mäuse auf die Entzündung, was eine antiinflammatorische Wirkung von ADAMTS13 vermuten lässt.

## 7 SUMMARY

The plasma metalloprotease ADAMTS13 cleaves ultralarge VWF into smaller multimers thereby preventing spontaneous platelet binding to VWF. Gradual reduction or deficiency of ADAMTS13 leads to Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP), a disease characterized by haemolytic anemia, thrombocytopenia and multiple microthrombosis. Without treatment TTP leads in 90% to death. Special triggers are needed for the onset of this disease. Some of them are well known, such as infections and some drugs. The underlying mechanism, however, of these triggers are not known so far. Two independent research groups developed Adamts13-deficient (Adamts13<sup>-/-</sup>) mice to investigate the pathophysiology of this disease. These mice are suitable to test trigger factors as they do not show any TTP Symptoms in untreated condition. Aim of this study was to establish a mouse model for further investigations on trigger factors of TTP. Therefore, frozen Adamts13<sup>-/-</sup> mouse embryos were purchased from Japan to build up an Adamts13<sup>-/-</sup> mouse breed. Adamts13 was not detectable neither in blood nor in liver or bone marrow tissue of these mice. Analysis of blood showed no differences in platelet counts, VWF antigen concentration, haematocrit or schistocytes between Adamts13<sup>-/-</sup> and wildtype mice. Loss of Adamts13 led to appearance of ultralarge VWF multimers and a prothrombotic status in a collagen/epinephrine model in these mice. Intravenous infection of rhVWF causes TTP typical symptoms in Adamts13<sup>-/-</sup> mice within minutes – especially profound thrombocytopenia. In contrast, wildtype mice showed only a minimal platelet decrease. Not only a human VWF concentrate without ultralarge VWF multimers but also the endogenous increase of VWF by histamine injections did not provoke thrombocytopenia neither in Adamts13<sup>-/-</sup> nor in wildtype mice. From this follows that mainly the quality but also the quantity of VWF is critical for the onset of an acute TTP episode.

Quinine is one of the most important drug-induced trigger factors for TTP in humans. A continuous Quinine intake against nocturnal leg cramps is one of the most cited reasons for drug induced TTP. A single intake of Quinine containing beverages can also evoke an acute TTP episode. Seeing that, the acute effect of a single high dose administration and the long term effect of continuous low dose Quinine administration was investigated in Adamts13<sup>-/-</sup> and wildtype mice. Both protocols showed no influence of Quinine on the general condition and blood cell counts in wildtype and knockout mice. To infer from that, Quinine induced thrombocytopenia seems to be an immune thrombocytopenia without an important influence of ADAMTS13.

Histones directly activate platelets and it was shown that their concentration is

## Summary

significantly increased during acute TTP episodes in patients. In mice histones induce profound thrombocytopenia in *Adamts13<sup>-/-</sup>* and wildtype mice within minutes. Intriguingly, injections of low histone concentrations caused distinct platelet decrease in wildtype mice in comparison to *Adamts13<sup>-/-</sup>* mice showing a subordinate role for histones in TTP episodes.

Lung aspergillosis as well as LPS induced acute lung injury did also not trigger thrombocytopenia in *Adamts13<sup>-/-</sup>* mice concluding bacterial and fungal infections of the lung are less relevant for TTP. However, these infections uncovered a reduced immune response of *Adamts13<sup>-/-</sup>* mice to infections leading to the hypothesis of an anti-inflammatory role of ADAMTS13.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Motto, D.G., et al., *Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2752-61.
2. Banno, F., et al., *Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3161-6.
3. Banno, F., A.K. Chauhan, and T. Miyata, *The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo: insights from mutant mice*. Int J Hematol, 2010. **91**(1): p. 30-5.
4. Chauhan, A.K., et al., *The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3452-7.
5. Apte, S.S., *A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(6): p. 981-5.
6. Le Goff, C. and V. Cormier-Daire, *The ADAMTS(L) family and human genetic disorders*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(R2): p. R163-7.
7. Banno, F. and T. Miyata, *Biology of an Antithrombotic Factor - ADAMTS13*. Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis, 2008. **1**: p. 162 - 176.
8. Furlan, M., et al., *Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3097-103.
9. Tsai, H.M., *Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4235-44.
10. Furlan, M., R. Robles, and B. Lammle, *Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4223-34.
11. Zheng, X., et al., *Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41059-63.
12. Levy, G.G., et al., *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. Nature, 2001. **413**(6855): p. 488-94.
13. Apte, S.S., *A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 31493-7.
14. Majerus, E.M., et al., *Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46643-8.
15. Gardner, M.D., et al., *A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13*. Blood, 2009. **113**(5): p. 1149-57.
16. Ai, J., et al., *The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29428-34.
17. Soejima, K., et al., *ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3232-7.
18. Zheng, X., et al., *Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30136-41.
19. Majerus, E.M., P.J. Anderson, and J.E. Sadler, *Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor*. J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 21773-8.
20. Zhou, W., et al., *ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells*. Lab Invest, 2005. **85**(6): p. 780-8.

21. Uemura, M., et al., *Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver*. Blood, 2005. **106**(3): p. 922-4.
22. Suzuki, M., et al., *Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(1): p. 212-6.
23. Turner, N., et al., *Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1396-404.
24. Bockmeyer, C.L., et al., *ADAMTS13--marker of contractile phenotype of arterial smooth muscle cells lost in benign nephrosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 2010.
25. Soejima, K., et al., *Analysis on the molecular species and concentration of circulating ADAMTS13 in Blood*. J Biochem, 2006. **139**(1): p. 147-54.
26. Furlan, M., et al., *Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Thromb Haemost, 1999. **81**(1): p. 8-13.
27. Banno, F., et al., *Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30896-903.
28. Zhou, W., E.E. Bouhassira, and H.M. Tsai, *An IAP retrotransposon in the mouse ADAMTS13 gene creates ADAMTS13 variant proteins that are less effective in cleaving von Willebrand factor multimers*. Blood, 2007. **110**(3): p. 886-93.
29. Anderson, P.J., K. Kokame, and J.E. Sadler, *Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 850-7.
30. Padilla, A., et al., *P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2150-6.
31. Dong, J.F., et al., *ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions*. Blood, 2002. **100**(12): p. 4033-9.
32. Dong, J.F., et al., *ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29633-9.
33. Dong, J.F., *Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1710-6.
34. Shim, K., et al., *Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress*. Blood, 2008. **111**(2): p. 651-7.
35. Siedlecki, C.A., et al., *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2939-50.
36. Tsai, H.M., Sussman, II, and R.L. Nagel, *Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2171-9.
37. Zhang, P., et al., *The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1887-94.
38. Moake, J.L., et al., *Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 1982. **307**(23): p. 1432-5.
39. Raife, T., et al., *Severe deficiency of VWF-cleaving protease (ADAMTS13) activity defines a distinct population of thrombotic microangiopathy patients*. Transfusion, 2004. **44**(2): p. 146-50.
40. Tsai, H.M., *Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Int J Hematol, 2010. **91**(1): p. 1-19.
41. Furlan, M. and B. Lammle, *Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von*

- Willebrand factor-cleaving protease*. Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(2): p. 437-54.
42. Tschopp, T.B., H.J. Weiss, and H.R. Baumgartner, *Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease*. J Lab Clin Med, 1974. **83**(2): p. 296-300.
43. Turitto, V.T., et al., *Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion*. Blood, 1985. **65**(4): p. 823-31.
44. Zimmerman, T.S., O.D. Ratnoff, and A.E. Powell, *Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor*. J Clin Invest, 1971. **50**(1): p. 244-54.
45. Weiss, H.J., Sussman, II, and L.W. Hoyer, *Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease*. J Clin Invest, 1977. **60**(2): p. 390-404.
46. Ginsburg, D., et al., *Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization*. Science, 1985. **228**(4706): p. 1401-6.
47. Collins, C.J., et al., *Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(13): p. 4393-7.
48. Titani, K., et al., *Amino acid sequence of human von Willebrand factor*. Biochemistry, 1986. **25**(11): p. 3171-84.
49. Sadler, J.E., et al., *Molecular biology of von Willebrand factor*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **614**: p. 114-24.
50. Schneppenheim, R. and U. Budde, *Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS13 in Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, B. Pötzsch and K. Madlener, Editors. 2010, Springer: Heidelberg p. 227 - 235.
51. Roth, G.J., et al., *Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen*. Biochemistry, 1986. **25**(26): p. 8357-61.
52. Pareti, F.I., et al., *Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1986. **261**(32): p. 15310-5.
53. Pareti, F.I., et al., *Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III*. J Biol Chem, 1987. **262**(28): p. 13835-41.
54. Cruz, M.A., et al., *Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19668.
55. Mohri, H., et al., *Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin, and collagen and characterization of its three distinct functional sites*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17361-7.
56. Foster, P.A., et al., *A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1987. **262**(18): p. 8443-6.
57. Foster, P.A., et al., *An immunogenic region within residues Val1670-Glu1684 of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 5230-4.
58. Lollar, P., D.C. Hill-Eubanks, and C.G. Parker, *Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1988. **263**(21): p. 10451-5.
59. Zheng, X.L. and J.E. Sadler, *Pathogenesis of thrombotic microangiopathies*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 249-77.
60. Wagner, D.D., *Cell biology of von Willebrand factor*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 217-46.



## Literaturverzeichnis

61. Wagner, D.D., J.B. Olmsted, and V.J. Marder, *Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 355-60.
62. Zucker, M.B., M.J. Broekman, and K.L. Kaplan, *Factor VIII-related antigen in human blood platelets: localization and release by thrombin and collagen*. J Lab Clin Med, 1979. **94**(5): p. 675-82.
63. Jeanneau, C., P. Avner, and Y. Sultan, *Use of monoclonal antibody and colloidal gold in E.M. localization of von Willebrand factor in megakaryocytes and platelets*. Cell Biol Int Rep, 1984. **8**(10): p. 841-8.
64. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers*. Cell, 1986. **46**(2): p. 185-90.
65. Levine, J.D., et al., *Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture*. Blood, 1982. **60**(2): p. 531-4.
66. Hamilton, K.K. and P.J. Sims, *Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 600-8.
67. Goerge, T., et al., *Secretion pores in human endothelial cells during acute hypoxia*. J Membr Biol, 2002. **187**(3): p. 203-11.
68. Mannucci, P.M., *How I treat patients with von Willebrand disease*. Blood, 2001. **97**(7): p. 1915-9.
69. Sadler, J.E., *von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22777-80.
70. Peyvandi, F., I. Garagiola, and L. Baronciani, *Role of von Willebrand factor in the haemostasis*. Blood Transfus, 2011. **9 Suppl 2**: p. s3-8.
71. Sadler, J.E., *von Willebrand factor: two sides of a coin*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1702-9.
72. Sadler, J.E., *Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2008. **112**(1): p. 11-8.
73. Hantgan, R.R., et al., *Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood*. Blood, 1990. **76**(2): p. 345-53.
74. Hantgan, R.R., W.L. Nichols, and Z.M. Ruggeri, *von Willebrand factor competes with fibrin for occupancy of GPIIb:IIIa on thrombin-stimulated platelets*. Blood, 1990. **75**(4): p. 889-94.
75. Savage, B., S.J. Shattil, and Z.M. Ruggeri, *Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11300-6.
76. Tuddenham, E.G., et al., *Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease*. Br J Haematol, 1982. **52**(2): p. 259-67.
77. Takahashi, Y., et al., *Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor*. Blood, 1987. **70**(5): p. 1679-82.
78. Fay, P.J., J.V. Coumans, and F.J. Walker, *von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2172-7.
79. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
80. Budde, U. and R. Schneppenheim, *Von Willebrand factor and von Willebrand disease*. Rev Clin Exp Hematol, 2001. **5**(4): p. 335-68; quiz following 431.
81. Schneppenheim, R. and U. Budde, *Von-Willebrand-Erkrankung*, in *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, B. Pötzsch and K. Madlener, Editors. 2010, Springer: Heidelberg. p. 355 - 363

82. Coppo, P. and A. Veyradier, *Thrombotic microangiopathies: towards a pathophysiology-based classification*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2009. **9**(1): p. 36-50.
83. Beutel, G., J.T. Kielstein, and A. Ganser, *[Thrombotic microangiopathy]*. Internist (Berl), 2013. **54**(9): p. 1070-9.
84. Kiss, J.E., *Thrombotic thrombocytopenic purpura: recognition and management*. Int J Hematol, 2010. **91**(1): p. 36-45.
85. Moschowitz, E., *An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease*. Am J Med, 1952. **13**(5): p. 567-9.
86. Amorosi, E.L. and J.E. Ultmann, *Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature*. Medicine, 1966. **45**: p. 139-159.
87. Rock, G.A., et al., *Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Canadian Apheresis Study Group. N Engl J Med, 1991. **325**(6): p. 393-7.
88. Moake, J.L., *Thrombotic microangiopathies*. N Engl J Med, 2002. **347**(8): p. 589-600.
89. Pisciotta, A.V., et al., *Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura by exchange transfusion*. Am J Hematol, 1977. **3**: p. 73-82.
90. Furlan, M., et al., *Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2839-46.
91. Furlan, M., et al., *von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1578-84.
92. Tsai, H.M. and E.C. Lian, *Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1585-94.
93. Fujikawa, K., et al., *Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1662-6.
94. Asada, Y., et al., *Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen*. Thromb Res, 1985. **38**(5): p. 469-79.
95. Hosler, G.A., A.M. Cusumano, and G.M. Hutchins, *Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(7): p. 834-9.
96. Hellmann, M., M. Hallek, and I. Scharrer, *[Thrombotic-thrombocytopenic purpura]*. Internist (Berl), 2010. **51**(9): p. 1136, 1138-44.
97. Upshaw, J.D., Jr., *Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia*. N Engl J Med, 1978. **298**(24): p. 1350-2.
98. Kokame, K., et al., *Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11902-7.
99. Schneppenheim, R., et al., *von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1845-50.
100. Fujimura, Y., et al., *Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 283-301.
101. Rieger, M., et al., *ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1262-7.

102. Pisoni, R., P. Ruggenenti, and G. Remuzzi, *Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management*. Drug Saf, 2001. **24**(7): p. 491-501.
103. Lammle, B., J.A. Kremer Hovinga, and L. Alberio, *Thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1663-75.
104. Hawkins, B.M., et al., *Clinical cardiac involvement in thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review*. Transfusion, 2008. **48**(2): p. 382-92.
105. Bell, W.R., et al., *Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients*. N Engl J Med, 1991. **325**(6): p. 398-403.
106. Allford, S.L., et al., *Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias*. Br J Haematol, 2003. **120**(4): p. 556-73.
107. Kremer Hovinga, J.A., et al., *Splenectomy in relapsing and plasma-refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Haematologica, 2004. **89**(3): p. 320-4.
108. Crowther, M.A., et al., *Splenectomy done during hematologic remission to prevent relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Ann Intern Med, 1996. **125**(4): p. 294-6.
109. Heidel, F., et al., *Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): p. 228-33.
110. Yomtovian, R., et al., *Rituximab for chronic recurring thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature*. Br J Haematol, 2004. **124**(6): p. 787-95.
111. Foley, S.R., et al., *A Canadian phase II study evaluating the efficacy of rituximab in the management of patients with relapsed/refractory thrombotic thrombocytopenic purpura*. Kidney Int Suppl, 2009(112): p. S55-8.
112. George, J.N., et al., *Rituximab therapy for thrombotic thrombocytopenic purpura: a proposed study of the Transfusion Medicine/Hemostasis Clinical Trials Network with a systematic review of rituximab therapy for immune-mediated disorders*. J Clin Apher, 2006. **21**(1): p. 49-56.
113. Mayr, F.B., et al., *The aptamer ARC1779 blocks von Willebrand factor-dependent platelet function in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura ex vivo*. Transfusion, 2010. **50**(5): p. 1079-87.
114. Knobl, P., et al., *Anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura*. Transfusion, 2009. **49**(10): p. 2181-5.
115. Chen, J., et al., *N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 593-603.
116. Laje, P., et al., *Correction of murine ADAMTS13 deficiency by hematopoietic progenitor cell-mediated gene therapy*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2172-80.
117. Trionfini, P., et al., *Adenoviral-mediated gene transfer restores plasma ADAMTS13 antigen and activity in ADAMTS13 knockout mice*. Gene Ther, 2009. **16**(11): p. 1373-9.
118. Falter, T., K.J. Alber, and I. Scharrer, *Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes*. Hamostaseologie, 2013. **33**(2): p. 113-20.
119. Ferrari, S., et al., *Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2815-22.

120. Peyvandi, F., et al., *ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission*. Haematologica, 2008. **93**(2): p. 232-9.
121. Luken, B.M., et al., *Multiple B-cell clones producing antibodies directed to the spacer and disintegrin/thrombospondin type-1 repeat 1 (TSP1) of ADAMTS13 in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(11): p. 2355-64.
122. Chauhan, A.K., et al., *Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 767-76.
123. Schiviz, A., et al., *A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13*. Blood, 2012. **119**(25): p. 6128-35.
124. Chauhan, A.K., et al., *ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2065-74.
125. De Meyer, S.F., et al., *Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5217-23.
126. Gandhi, C., et al., *ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5224-30.
127. Khan, M.M., et al., *ADAMTS13 reduces VWF-mediated acute inflammation following focal cerebral ischemia in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(8): p. 1665-71.
128. Zhao, B.Q., et al., *von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3329-34.
129. Fujioka, M., et al., *ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion*. Blood, 2010. **115**(8): p. 1650-3.
130. De Meyer, S.F., et al., *von Willebrand factor: an emerging target in stroke therapy*. Stroke, 2012. **43**(2): p. 599-606.
131. Gandhi, C., et al., *ADAMTS13 reduces vascular inflammation and the development of early atherosclerosis in mice*. Blood, 2012. **119**(10): p. 2385-91.
132. Jin, S.Y., et al., *Genetic ablation of Adamts13 gene dramatically accelerates the formation of early atherosclerosis in a murine model*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1817-23.
133. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
134. Ruggeri, Z.M. and T.S. Zimmerman, *Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets*. J Clin Invest, 1980. **65**(6): p. 1318-25.
135. Hoyer, L.W. and J.R. Shainoff, *Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers*. Blood, 1980. **55**(6): p. 1056-9.
136. Budde, U., et al., *Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes*. Thromb Haemost, 1990. **63**(2): p. 312-5.
137. Wagner, D.D., *The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 105-10.
138. Fuchs, T.A., et al., *Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies*. Blood, 2012. **120**(6): p. 1157-64.

139. Gottschall, J.L., et al., *Quinine-induced immune thrombocytopenia associated with hemolytic uremic syndrome: a new clinical entity*. Blood, 1991. **77**(2): p. 306-10.
140. Gottschall, J.L., et al., *Quinine-induced immune thrombocytopenia with hemolytic uremic syndrome: clinical and serological findings in nine patients and review of literature*. Am J Hematol, 1994. **47**(4): p. 283-9.
141. Baliga, R.S. and C.S. Wingo, *Quinine induced HUS-TTP: an unusual presentation*. Am J Med Sci, 2003. **326**(6): p. 378-80.
142. Kojouri, K., S.K. Vesely, and J.N. George, *Quinine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: frequency, clinical features, and long-term outcomes*. Ann Intern Med, 2001. **135**(12): p. 1047-51.
143. *Blood chemistry and hematology in 8 inbred strains of mice*. October 2013; 1.4:[Available from: <http://phenome.jax.org/db/qp?rtn=views/rawdata&measnum=23914&strain=129S2%2FSvPas>].
144. Champy, M.F., et al., *Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse*. Mamm Genome, 2008. **19**(5): p. 318-31.
145. Prufer, S., et al., *Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of Aspergillus fumigatus pneumonia in mice*. Immunobiology, 2013.
146. Turecek, P.L., et al., *Structure and function of a recombinant von Willebrand factor drug candidate*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(5): p. 510-21.
147. Mazurier, C., et al., *In vitro study of a triple-secured von Willebrand factor concentrate*. Vox Sang, 2004. **86**(2): p. 100-4.
148. Fuchs, T.A., A.A. Bhandari, and D.D. Wagner, *Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3708-14.
149. Claus, R.A., et al., *Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure*. Thromb Haemost, 2009. **101**(2): p. 239-47.
150. Lambers, M., et al., *Role of reduced ADAMTS13 in arterial ischemic stroke: a pediatric cohort study*. Ann Neurol, 2013. **73**(1): p. 58-64.
151. Kaikita, K., et al., *Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(11): p. 2490-3.
152. Harvey, P.J., et al., *A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels*. Br J Haematol, 2000. **109**(2): p. 349-53.
153. Lillicrap, D., *von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy*. Blood, 2013. **122**(23): p. 3735-40.
154. Schneppenheim, R. and U. Budde, *von Willebrand-Syndrom und von Willebrand-Faktor - Aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie*. 1 ed. 2004, Bremen: UNI-MED 85.
155. Moake, J.L. and P.D. McPherson, *Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome*. Am J Med, 1989. **87**(3N): p. 9N-15N.
156. Barnes, M.J., C.G. Knight, and R.W. Farndale, *The collagen-platelet interaction*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(5): p. 314-20.
157. Furie, B.C. and B. Furie, *Tissue factor pathway vs. collagen pathway for in vivo platelet activation*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 135-8.
158. Cooley, B.C., *Collagen-induced thrombosis in murine arteries and veins*. Thromb Res, 2013. **131**(1): p. 49-54.
159. Farndale, R.W., *Collagen-induced platelet activation*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 162-5.
160. DiMinno, G. and M.J. Silver, *Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol*. J Pharmacol Exp Ther, 1983. **225**(1): p. 57-60.

161. Feys, H.B., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus)*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2005-10.
162. George, J.N., *Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 2006. **354**(18): p. 1927-35.
163. Vesely, S.K., et al., *ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients*. Blood, 2003. **102**(1): p. 60-8.
164. Vanhoorelbeke, K. and S.F. De Meyer, *Animal models for thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 2-10.
165. Bianchi, V., et al., *Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2002. **100**(2): p. 710-3.
166. Raife, T.J., et al., *Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1666-74.
167. Mohlke, K.L., et al., *Mvwf, a dominant modifier of murine von Willebrand factor, results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase*. Cell, 1999. **96**(1): p. 111-20.
168. Lowenstein, C.J., C.N. Morrell, and M. Yamakuchi, *Regulation of Weibel-Palade body exocytosis*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(8): p. 302-8.
169. Jahr, S., et al., *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
170. Martinod, K. and D.D. Wagner, *Thrombosis: tangled up in NETs*. Blood, 2013.
171. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
172. von Kockritz-Blickwede, M., et al., *Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3070-80.
173. Carestia, A., et al., *Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 1035-45.
174. Semeraro, F., et al., *Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4*. Blood, 2011. **118**(7): p. 1952-61.
175. Xu, J., et al., *Extracellular histones are major mediators of death in sepsis*. Nat Med, 2009. **15**(11): p. 1318-21.
176. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
177. Rosove, M.H., *Thrombotic microangiopathies*. Semin Arthritis Rheum, 2013.
178. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
179. Ward, C.M., et al., *Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone*. Thromb Res, 1997. **86**(6): p. 469-77.
180. Zimmerman, T.S., Z.M. Ruggeri, and C.A. Fulcher, *Factor VIII/von Willebrand factor*. Prog Hematol, 1983. **13**: p. 279-309.
181. Park, Y.A., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and urinary tract infections: is there a connection?* Am J Clin Pathol, 2011. **135**(1): p. 85-8.
182. Douglas, K.W., et al., *Infection frequently triggers thrombotic microangiopathy in patients with preexisting risk factors: a single-institution experience*. J Clin Apher, 2010. **25**(2): p. 47-53.
183. Medina, P.J., J.M. Sipols, and J.N. George, *Drug-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(5): p. 286-93.

184. Christie, D.J., P.C. Mullen, and R.H. Aster, *Quinine- and quinidine platelet antibodies can react with GPIIb/IIIa*. Br J Haematol, 1987. **67**(2): p. 213-9.
185. Visentin, G.P., P.J. Newman, and R.H. Aster, *Characteristics of quinine- and quinidine-induced antibodies specific for platelet glycoproteins IIb and IIIa*. Blood, 1991. **77**(12): p. 2668-76.
186. Hou, M., et al., *Multiple quinine-dependent antibodies in a patient with episodic thrombocytopenia, neutropenia, lymphocytopenia, and granulomatous hepatitis*. Blood, 1997. **90**(12): p. 4806-11.
187. Asvadi, P., Z. Ahmadi, and B.H. Chong, *Drug-induced thrombocytopenia: localization of the binding site of GPIX-specific quinine-dependent antibodies*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1670-7.
188. Chong, B.H., et al., *Characterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinine/quinidine-dependent antibodies*. Blood, 1991. **77**(10): p. 2190-9.
189. Belkin, G.A., *Cocktail purpura. An unusual case of quinine sensitivity*. Ann Intern Med, 1967. **66**(3): p. 583-6.
190. Webb, R.F., et al., *Acute intravascular haemolysis due to quinine*. N Z Med J, 1980. **91**(651): p. 14-6.
191. Spearing, R.L., et al., *Quinine-induced disseminated intravascular coagulation*. Lancet, 1990. **336**(8730): p. 1535-7.
192. Barr, E., J.F. Douglas, and C.M. Hill, *Recurrent acute hypersensitivity to quinine*. BMJ, 1990. **301**(6747): p. 323.
193. Stroncek, D.F., et al., *Characterization of multiple quinine-dependent antibodies in a patient with episodic hemolytic uremic syndrome and immune agranulocytosis*. Blood, 1992. **80**(1): p. 241-8.
194. Kunicki, T.J., et al., *Further studies of the human platelet receptor for quinine- and quinine-dependent antibodies*. J Immunol, 1981. **126**(2): p. 398-402.
195. Bougie, D.W., P.R. Wilker, and R.H. Aster, *Patients with quinine-induced immune thrombocytopenia have both "drug-dependent" and "drug-specific" antibodies*. Blood, 2006. **108**(3): p. 922-7.
196. Pfueller, S.L., et al., *Expression of the drug-dependent antigen for quinine-dependent antiplatelet antibodies on GP IIIa but not that on GPIb, IIb or IX on human endothelial cells*. Thromb Haemost, 1990. **63**(2): p. 279-81.
197. Glynn, P., et al., *Quinine-induced immune thrombocytopenic purpura followed by hemolytic uremic syndrome*. Am J Kidney Dis, 1999. **33**(1): p. 133-7.
198. Story, D., A. Hall, and P. Older, *Quinine-induced haemolytic uraemic syndrome*. Anaesth Intensive Care, 1994. **22**(1): p. 114-5.
199. McDonald, S.P., et al., *Quinine-induced hemolytic uremic syndrome*. Clin Nephrol, 1997. **47**(6): p. 397-400.
200. Crum, N.F. and P. Gable, *Quinine-induced hemolytic-uremic syndrome*. South Med J, 2000. **93**(7): p. 726-8.
201. Hagley, M.T., et al., *Hemolytic-uremic syndrome associated with ingestion of quinine*. Am J Nephrol, 1992. **12**(3): p. 192-5.
202. Cataland, S.R. and H.M. Wu, *Atypical hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: clinically differentiating the thrombotic microangiopathies*. Eur J Intern Med, 2013. **24**(6): p. 486-91.
203. Thompson, R.A. and M.H. Winterborn, *Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin*. Clin Exp Immunol, 1981. **46**(1): p. 110-9.
204. Hodgkins, K.S., et al., *Clinical grand rounds: atypical hemolytic uremic syndrome*. Am J Nephrol, 2012. **35**(5): p. 394-400.
205. Schmidtke, J., et al., *Treatment of atypical hemolytic uremic syndrome and thrombotic microangiopathies: a focus on eculizumab*. Am J Kidney Dis, 2013. **61**(2): p. 289-99.

206. Chapin, J., et al., *Complement factor H mutations are present in ADAMTS13-deficient, ticlopidine-associated thrombotic microangiopathies*. Blood, 2013. **121**(19): p. 4012-3.
207. Tsai, E., et al., *Use of eculizumab in the treatment of a case of refractory, ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: additional data and clinical follow-up*. Br J Haematol, 2013. **162**(4): p. 558-9.
208. Feng, S., et al., *Partial ADAMTS13 deficiency in atypical hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2013. **122**(8): p. 1487-93.
209. George, J.N., J.E. Sadler, and B. Lammle, *Platelets: thrombotic thrombocytopenic purpura*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 315-34.
210. Park, Y.A., et al., *Is it quinine TTP/HUS or quinine TMA? ADAMTS13 levels and implications for therapy*. J Clin Apher, 2009. **24**(3): p. 115-9.
211. Pollock, K.G., et al., *Clinical surveillance of thrombotic microangiopathies in Scotland, 2003-2005*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(1): p. 115-21.
212. Ono, T., et al., *Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure*. Blood, 2006. **107**(2): p. 528-34.
213. Nguyen, T.C., et al., *Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis*. Haematologica, 2007. **92**(1): p. 121-4.
214. Reiter, R.A., et al., *Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation*. Thromb Haemost, 2005. **93**(3): p. 554-8.
215. Lerolle, N., et al., *von Willebrand factor is a major determinant of ADAMTS-13 decrease during mouse sepsis induced by cecum ligation and puncture*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 843-50.
216. Rubin, D.B., et al., *Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome*. J Clin Invest, 1990. **86**(2): p. 474-80.
217. Page, A.V. and W.C. Liles, *Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases*. Virulence, 2013. **4**(6): p. 507-16.
218. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
219. Bernardo, A., et al., *Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow*. Blood, 2004. **104**(1): p. 100-6.
220. Martin, K., et al., *Decreased ADAMTS-13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure*. Crit Care Med, 2007. **35**(10): p. 2375-82.
221. Mimuro, J., et al., *Unbalanced expression of ADAMTS13 and von Willebrand factor in mouse endotoxemia*. Thromb Res, 2008. **122**(1): p. 91-7.
222. Stahl, A.L., et al., *Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2006. **108**(1): p. 167-76.
223. Liu, D., et al., *Suppressive effect of CORM-2 on LPS-induced platelet activation by glycoprotein mediated HS1 phosphorylation interference*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83112.
224. Zhang, K., et al., *Different mechanism of LPS-induced calcium increase in human lung epithelial cell and microvascular endothelial cell: a cell culture study in a model for ARDS*. Mol Biol Rep, 2014.
225. Prüfer, S., *Zelluläre und molekulare Mechanismen der angeborenen Immunität*. 2013.



## Literaturverzeichnis

- 226. Pendu, R., et al., *P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3746-52.
- 227. Bernardo, A., et al., *Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(3): p. 562-70.

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Humanes ADAMTS13-Gen und Protein modifiziert nach Zheng et al. 2001 [11] und Banno und Miyata 2008 [7].  | 12 |
| Abbildung 2: Murines Adamts13 modifiziert nach Zheng et al. 2001 [11] und Banno und Miyata 2008 [7].  | 13 |
| Abbildung 3: Die Domänenstruktur des VWF-Moleküls modifiziert nach Schneppenheim und Budde [50] und Tsai [40] mit ihren funktionellen Gruppen.  | 15 |
| Abbildung 4: Pathophysiologie der primären TTP modifiziert nach Hellmann, Hallek, Scharrer [96].  | 22 |
| Abbildung 5: Repräsentative gelelektrophoretische Auftrennung der vervielfältigten DNS-Abschnitte des Adamts13-Gens von Wildtyp (129/Sv WT) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen.   | 54 |
| Abbildung 6: Schmelzkurve des Adamts13 (Peak des cDNS Fragments bei 82 °C) und L32 Abschnitts (Peak des cDNS Fragments bei 88 °C) aus Leber von Wildtyp (rosa) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot).                                    | 55 |
| Abbildung 7: Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzemission bei 521 nm während der qRT-PCR für Adamts13 (Ct-Wert: 26 Zyklen) und L32 (Ct-Wert: 21,8 Zyklen) aus Leber von Wildtyp (rosa) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot).          | 55 |
| Abbildung 8: Schmelzkurve des Adamts13 (Peak des cDNS Fragments bei 82 °C) und L32 Abschnitts (Peak des cDNS Fragments bei 88 °C) aus Knochenmark von Wildtyp (grün) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (blau).                             | 56 |
| Abbildung 9: Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzemission bei 521 nm während der qRT-PCR für Adamts13 (Ct-Wert: 36,2 Zyklen) und L32 (Ct-Wert: 21,4 Zyklen) aus Knochenmark von Wildtyp (grün) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (blau). | 57 |
| Abbildung 10: Standardgeraden des Adamts13-Aktivitätsassays.  | 58 |
| Abbildung 11: Lineare Regressionsgerade ermittelt aus den Steigungen der Standardgeraden.   | 58 |
| Abbildung 12: Vergleich der Adamts13-Aktivität in Mausplasma von Wildtyp (129/Sv) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen.   | 59 |
| Abbildung 13: Lineare Regressionsgerade ermittelt aus den OD (optische Dichte) Werten der Verdünnungsreihe aus humanem EDTA-Plasma mit bekanntem VWF:AG Gehalt.   | 60 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 14: Dot-Plot der VWF:AG Konzentrationen im Plasma von Wildtyp und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen.   | 60 |
| Abbildung 15: Einteilung der VWF Multimere und repräsentativer Vergleich des Multimerusters eines TTP-Patienten (TTP) mit humanem Normalpoolplasma (NP) und Plasma einer Wildtyp (WT) Maus mit Plasma einer Adamts13 <sup>-/-</sup> (KO) Maus in einem 1% Agarosegel. | 61 |
| Abbildung 16: Repräsentative densitometrische Darstellung der VWF Multimere im Plasma einer Wildtyp (WT) Maus und einer Adamts13 <sup>-/-</sup> (KO) Maus in einem 1% Agarosegel.   | 62 |
| Abbildung 17: VWF Multimermuster von jeweils 4 Adamts13 <sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäusen in einem 1% Agarosegel im Vergleich zu Normalpoolplasma (NP) und Plasma eines TTP-Patienten (TTP).   | 63 |
| Abbildung 18: Dot-Plot der Thrombozytenzahlen in EDTA-Blut von Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (n=11) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=10).  | 64 |
| Abbildung 19: Dot-Plot des Hämoglobingehalts in EDTA-Blut von Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (n=15) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=15).   | 64 |
| Abbildung 20: Dot-Plot des Hämatokrits in EDTA-Blut von Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (n=16) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=16).   | 65 |
| Abbildung 21: Dot-Plot der Leukozytenzahlen im EDTA-Blut von Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (n=10) und Wildtyp (129/Sv) Mäusen (n=12).  | 65 |
| Abbildung 22: Dot-Plot des Thrombozytenverbrauchs in einem <i>in vivo</i> Thrombose Modell.   | 66 |
| Abbildung 23: Dot-Plot der Thrombozytenzahlen der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 RCoU/kg KGW des rhVWF.   | 67 |
| Abbildung 24: Vergleich der verbleibenden Thrombozytenzahlen in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 RCoU/kg KGW des rhVWF.   | 67 |
| Abbildung 25: Hämatokrit der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.  | 68 |
| Abbildung 26: Vergleich des Hämatokritabfalls in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.  | 68 |
| Abbildung 27: Hämoglobinwerte der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.   | 69 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 28: Vergleich des Hämoglobinabfalls in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.  | 69 |
| Abbildung 29: VWF:AG Konzentrationen der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=9) und Wildtyp (129/Sv) (n=8) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.  | 70 |
| Abbildung 30: Vergleich des VWF:AG Anstiegs in Prozent zum Ausgangswert 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.  | 70 |
| Abbildung 31: Repräsentative Blutausstriche von je einer Wildtyp (129/Sv) und einer Adamts13 <sup>-/-</sup> Maus vor und 8h nach Behandlung mit 2000 VWF:RCoU/kg KGW des rhVWF.   | 71 |
| Abbildung 32: Thrombozytenzahlen der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n≥3) und Wildtyp (129/Sv) (n≥3) Mäuse vor (unbehandelt) und 8h nach Behandlung mit 2000 (2000U/kg) bzw. 4000 (4000U/kg) VWF:RCoU/kg KGW des VWF-Konzentrats (Wilfactin®). | 72 |
| Abbildung 33: VWF:AG Konzentrationen der Adamts13 <sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäuse vor und 8h nach Behandlung mit 2000 (2000U/kg) VWF:RCoU/kg KGW des VWF-Konzentrats (Wilfactin®).  | 73 |
| Abbildung 34: VWF Multimermuster von jeweils 2 Proben mit rhVWF und mit humanem VWF Konzentrat in einem 1% Agarosegel.  | 74 |
| Abbildung 35: Densitometrische Darstellung der VWF Multimere eines humanen VWF Konzentrats (blau) und des rekombinanten humanen VWFs (rot) in einem 1% Agarosegel.  | 75 |
| Abbildung 36: Vergleich des basalen VWF:AG Gehalts bei 129/Sv Wildtyp Mäusen (n=10) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen (n=11).  | 76 |
| Abbildung 37: Einfluss der Histamininjektion auf den VWF:AG Gehalt im Blut der 129/Sv Wildtyp und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse.  | 77 |
| Abbildung 38: VWF Multimermuster von Adamts13 <sup>-/-</sup> und Wildtyp (129/Sv) Mäusen nach Histamin Behandlung in einem 1% Agarosegel im Vergleich zu Normalpoolplasma (NP) und Plasma eines TTP-Patienten (TTP).                    | 78 |
| Abbildung 39: Thrombozytenzahlen der 129/Sv Wildtyp (n≥7) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse (n≥8).  | 79 |
| Abbildung 40: Histon-induzierter Thrombozytenabfall bei 129/Sv Wildtyp Mäusen und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen.   | 80 |
| Abbildung 41: Verlauf der Thrombozytenzahlen der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n≥4, obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse (n≥4, untere beiden Kurven) über   |    |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin.  | 81 |
| Abbildung 42: Verlauf der Hämoglobin-Konzentrationen der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n≥4, obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse (n≥4, untere beiden Kurven) über einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin.                                    | 82 |
| Abbildung 43: Verlauf des Körpergewichts der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n≥4, obere beiden Kurven) und 129/Sv Mäuse (n≥4, untere beiden Kurven) über einen Zeitraum von 18 Tagen nach Behandlung mit hochdosiertem Chinin.  | 83 |
| Abbildung 44: Repräsentative Blutaussstriche einer unbehandelten (Sham) und einer Chinin-behandelten Adamts13 <sup>-/-</sup> Maus von Tag 0 (vor Behandlung) und Tag 15 nach Behandlung. Pappenheimfärbung, 1000–fache Vergrößerung.                                   | 83 |
| Abbildung 45: Verlauf der Thrombozytenzahlen während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse.   | 85 |
| Abbildung 46: Verlauf des Hämoglobingehalts während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv (n=3) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse (n≥3).  | 85 |
| Abbildung 47: Verlauf des Körpergewichts während der niedrigdosierten, kontinuierlichen Chininbehandlung der 129/Sv (n=3) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse (n≥3).   | 86 |
| Abbildung 48: Repräsentative Blutaussstriche einer unbehandelten (Sham) und einer Chinin-behandelten Adamts13 <sup>-/-</sup> Maus von Tag 0 (vor Behandlung) und Tag 36 nach Behandlung. Pappenheimfärbung, 1000–fache Vergrößerung.                                   | 86 |
| Abbildung 49: Thrombozytenzahlen der 129/Sv (n=12) und Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=11) Mäuse vor Auslösung einer akuten Lungenschädigung mittels LPS und 8h nach LPS-Behandlung.  | 88 |
| Abbildung 50: Veränderung der Leukozytenzahlen infolge der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung bei 129/Sv (n=11) und Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=12) Mäusen.  | 89 |
| Abbildung 51: Thrombozytenzahlen im Blut der unbehandelten und <i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>A. fumigatus</i> ) (100 µl einer 10 <sup>7</sup> Konidien/ml Aspergilluslösung) behandelten 129/Sv (n=7) und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse (n=7) 24 h nach Infektion. | 90 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 52: Veränderung der Leukozytenzahlen im Blut infolge der <i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>A. fumigatus</i> ) induzierten akuten Lungenentzündung bei 129/Sv und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäusen.   | 91 |
| Abbildung 53: Prozentualer Anteil der Granulozyten (anti-Gr-1 positive Zellen) an der Gesamtzahl der Leukozyten im Blut unbehandelter (n=3) und <i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>A. fumigatus</i> ) infizierter (n≥7) 129/Sv und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse 24 h nach Infektion. | 92 |
| Abbildung 54: Anzahl der Granulozyten (absolute Zellzahl) in der Bronchoalveolarlavage Flüssigkeit (BALF) unbehandelter (n=3) und <i>Aspergillus fumigatus</i> infizierter (n≥7) 129/Sv und Adamts13 <sup>-/-</sup> Mäuse 24h nach Infektion.  | 93 |
| Abbildung 55: Überlebenskurve der Adamts13 <sup>-/-</sup> (n=6) und 129/Sv (n=8) Mäuse nach Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i> .   | 94 |
| Abbildung 56: Colony forming units (CFU) aus Lungenhomogenaten der Adamts13 <sup>-/-</sup> und 129/Sv Mäuse 24 h nach <i>Aspergillus fumigatus</i> Infektion.  | 94 |

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Einteilung der TMA nach der Grundursache der Erkrankung<br>modifiziert nach Kiss [84]          | 19 |
| Tabelle 2: Einteilung der TMA anhand der ADAMTS13 Aktivität modifiziert<br>nach Coppo und Veyradier [82]. | 20 |
| Tabelle 3: Klinische und labordiagnostische Parameter zur Diagnose der TTP<br>nach Hellmann [96]          | 24 |
| Tabelle 4: Übersicht der Mausmodelle für die Untersuchung der angeborenen<br>TTP                          | 29 |
| Tabelle 5: Antikörper   | 31 |
| Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung der Adamts13 <sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäuse                   | 31 |
| Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien  | 32 |
| Tabelle 8: Chemikalienliste   | 33 |
| Tabelle 9: Puffer   | 35 |
| Tabelle 10: Kitsysteme  | 37 |
| Tabelle 11: Geräte  | 37 |
| Tabelle 12: PCR Protokoll der Genotypisierung von Adamts13 <sup>-/-</sup> und Wildtyp<br>Mäusen           | 40 |
| Tabelle 13: qRT-PCR Programm  | 42 |

## **11 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Katharina Ebner



## **12 WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE**

### **12.1 POSTER AUF KONGRESSSEN**

**Triggering of Adamts13-knockout mice with quinine.**

K. Alber, T. Falter, K. Jurk, I. Scharrer

Hämophilie Symposium 11/2012

**Administration of oral Quinine or intratracheal LPS fail to induce thrombocytopenia in ADAMTS13 deficient mice.**

K. Alber, T. Falter, K. Jurk, M. Bosmann, I. Scharrer

GTH 02/2013

**Progress and long term effects of 15 patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura.**

K. Alber, T. Falter, I. Scharrer

GTH 02/2013

**An unexpected role of the von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS-13 during experimental inflammation in lungs.**

M. Bosmann, K. Alber, T. Falter, K. Jurk, M. Theobald, I. Scharrer

EHA 2013

**Sequelae of chronic relapsing idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura.**

K. Alber, T. Falter, S. Wagner, A. Tadic, I. Scharrer

ISTH 06/2013

**Gut microbial communities impact on von Willebrand Factor multimer levels**

M. Lillich, S. Jäckel, K. Alber, N. Hörmann, U. Walter, C. Reinhardt

GTH 02/2014

## **12.2 VERÖFFENTLICHUNGEN**

**Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes.**

T. Falter, K.J. Alber und I. Scharrer

Hämostaseologie, 2013. 33(2): p. 113-20

## **13 DANKSAGUNG**

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin und an Frau Prof. Dr. Inge Scharrer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die „externe“ Betreuung und schnelle Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke insbesondere Markus Radsak und Kerstin Jurk, die mir stets Ansprechpartner waren und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten.

Herzlichen Dank an Simone, Sandra und Teresa für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen meinen Kollegen und Mitarbeitern und dem gesamten CTH-Forschungsteam für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Tanja F., Nives, Klytaimnistra, Steve, Tanja S., Cora, Kathrin, Mareike, Jennifer und Sven bedanken - ohne euch hätte das Arbeiten nur halb so viel Spaß gemacht!

Der größte Dank geht an meine Familie, meine Eltern und Großeltern, die immer an mich geglaubt haben und ganz besonders an meinen Ehemann Martin, der mich immer unterstützt, motiviert und aufgemuntert hat.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**ISBN: 978-3-8359-6287-3**



9 783835 196287 3